

大蒜废弃物对农作物病原菌的抑制效果

高晓荔¹, 宋永辉², 胡林潮¹, 刘玮晶¹, 孙德峰³, 代静玉^{1*}

(1.南京农业大学资源与环境科学学院, 南京 210095; 2.南京大学环境学院, 南京 210046; 3.吉林省长岭县农业局, 吉林 长岭 131500)

摘要:我国大蒜废弃物资源丰富,为引导其合理化、资源化利用,测定了大蒜提取物对大豆尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum f.sp. tracheiphilum*)、油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*(Lib.) de Bary)、大豆细菌性斑点病菌(*Pseudomonas.syringae pv.glycinea*)和水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae pv.oryzae*[Ishiyama] Dye,Xoo)4种植物病原菌的抑制作用,并通过大蒜提取物、大蒜渣、大蒜肥对土壤中大豆尖孢镰刀菌的抑制试验,测定了其在土壤中对土传病原菌的抑制效果。结果表明,高浓度的大蒜提取物对这4种植物病原菌有抑制作用,随着提取物浓度的升高,抑菌效果也更为明显。质量浓度为500 mg·mL⁻¹时对大豆尖孢镰刀菌、大豆细菌性斑点病菌和水稻白叶枯病菌的抑菌效果最好。培养基中提取物浓度达100 mg·mL⁻¹时对两种真菌的抑制达100%。同时,含大蒜提取物0.05 mL·g⁻¹、大蒜渣5%或大蒜肥25%的土壤能抑制土传病原菌大豆尖孢镰刀菌在土壤中的定殖。

关键词:大蒜;废弃物;农作物病原微生物;抑制作用

中图分类号:X712 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2012)01-0192-08

Inhibitory Effects of Garlic Waste on Pathogenic Microorganisms of Corps

GAO Xiao-li¹, SONG Yong-hui², HU Lin-chao¹, LIU Wei-jing¹, SUN De-feng³, DAI Jing-yu^{1*}

(1.School of Resource and Environment, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, China; 2.School of Environment, Nanjing University, Nanjing 210046, China; 3.Jilin Changling County Bureau of Agriculture, Changling 131500, China)

Abstract: Garlic extract has a broad spectrum of antibacterial activity, so garlic products have been widely used in food, medicine, animal breeding, agriculture, and so on. The planting area of garlic in our country is more than a third of the total cultivated area of the world. Most of them are for direct food consumption, rough machining, primary products, export, therefore, garlic waste resource is very abundant. In order to discuss the role of garlic waste on crop disease prevention and determine the reasonable dosage of garlic extract to restrain the pathogenic bacteria and not to hurt crops, we carried out the experiment of antibacterial effect of garlic extract, the antibacterial activity and inhibitory effect tests of garlic extract and garlic slag on soil-spread pathogen, *Fusarium oxysporum f.sp.tracheiphilum*.

The inhibitory effects of garlic extract on four kinds of plant pathogen as *Fusarium oxysporum f.sp. tracheiphilum*, *Sclerotinia sclerotiorum*(Lib.) de Bary, *Pseudomonas. syringae pv.glycinea* and *Xanthomonas oryzae pv.oryzae* (Ishiyama) Dye,Xoo, were determined. Meanwhile, the inhibitory effect of garlic extract, garlic slag and garlic fertilizer on soil spread pathogen *Fusarium oxysporum f.sp.tracheiphilum* were determined. The results of paper disc method to determine the inhibitory effect of garlic extract on pathogen showed that garlic extract had different levels of inhibition on the three plant pathogenic bacteria. Besides, antibacterial effect was more apparent along with extract concentration increase. When its concentration was 100 mg·mL⁻¹, it had inhibitory effect on *Fusarium oxysporum f.sp.tracheiphilum* and *Pseudomonas.syringae pv.glycinea*. When its concentration was 300 mg·mL⁻¹, it had inhibitory effect on *Xanthomonas oryzae pv.oryzae* [Ishiyama] Dye, Xoo. Antibacterial effect on the three pathogenic bacteria was strongest at 500 mg·mL⁻¹ concentration. The experimental results of hypha growth rate determination to showed that it had apparent inhibitory effect on the growth of *Fusarium oxysporum f.sp.tracheiphilum* when garlic extract was 20 mg·mL⁻¹ of the culture medium and the growth was completely restrained when the concentration reached 100 mg·

收稿日期:2011-04-17

基金项目:江苏省科技支撑项目(BE2009382)

作者简介:高晓荔(1986—),女,内蒙古赤峰人,在读硕士生,从事固体废弃资源的开发与利用研究。E-mail:2009103070@njau.edu.cn

* 通讯作者:代静玉 E-mail:daijy@njau.edu.cn

mL^{-1} 。The culture medium with $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ garlic extract had inhibitory effect on *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, and it was fully inhibited when concentration reached only $30 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。In the inhibitory experiment of garlic extract, slag, fertilizer on *Fusarium oxysporum f.sp.tracheiphilum* in the soil, garlic extract could effectively restrain its reproduction. Soil applied with $0.05 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ garlic extract or 5% garlic slag or 25% garlic fertilizer could inhibit the reproduction of soil-spread *Fusarium oxysporum f.sp.tracheiphilum*。

Keywords: garlic; waste; pathogenic microorganisms of crops; inhibitory effects

我国是农业大国,农业在我国国民经济中占重要地位,农作物的产量、质量等农业问题事关整个国计民生。而有统计表明我国每年因病虫害造成的粮食减产高达同期粮食生产的9%。在全球气候变暖等多种因素作用下,菌核病(*Sclerotinia sclerotiorum*)、枯萎病(*Fusarium oxysporum*)、霜霉病(*Pseudoperonospora cubensis*)、根腐病(*Fusarium solan*)等作物病害的危害加剧,引起更严重的作物减产^[1]。

油菜菌核病菌引发油菜菌核病,使油菜产量损失达5%~30%^[2]。近年选育抗菌核病品种后,菌核病发病率下降到5%以下^[3],但因此造成的减产仍不容忽视。水稻白叶枯病引起的我国水稻减产严重时达50%以上,甚至颗粒无收^[4]。徐成荣等已测定出广西地不容块根提取物(罗默碱)对水稻白叶枯病菌有较好的抑菌活性^[5]。大豆细菌性斑点病是大豆产区普遍发生的病害,有的地区发病率最高可达100%^[6]。同时土壤中病原菌等因素的作用使连作大豆减产15%~30%^[7],大豆尖孢镰刀菌是土传病原菌,寄主范围较广,在土壤中能长期存活,是引起大豆根腐病的主要原因,严重影响大豆生产。例如在黑龙江地区,大豆根腐病的严重发病率高达70%~90%,因根腐病造成大豆减产达10%~40%^[8]。

常用的化学农药大多会污染环境,陈志杰等在对黄瓜土传病害防治中采用太阳能消毒、合理轮作、健身栽培等技术虽在一定程度上有效果,但因地域性较强而不利于推广^[9]。研发能广泛使用的环境友好型天然产物用于农作物病害防治,对农业的可持续发展至关重要。

我国的大蒜种植面积约占世界总种植面积的1/3。直接食用或经初加工出口^[10],越来越多的大蒜副产品的处置也成为困扰人们的一个难题。大蒜废弃物堆积田头,或放入沟渠河流,造成严重的环境污染。大蒜提取物具有广谱抗菌活性,对常见的G⁺和G⁻细菌均有较好的抗菌作用^[11-12]。大蒜产品现已广泛应用于食品、医学、养殖业、农业等多种领域,大蒜提取物对植物病原菌的抑制也早有研究,同时其作为植物源农药在生产中应用国内外均有报道^[13-18]。保护地试验中发现含大蒜成分的肥料施用量过高会使农作物产生不同程

度的烧苗现象。在以大豆(大豆易受大豆尖孢镰刀菌等土传病原菌的侵染)为例的前期试验中也发现大蒜提取物、大蒜渣和大蒜肥会对大豆幼苗的正常生长产生影响:培养基质(蛭石与草炭以体积比1:1混合)中含有 $0.2 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 大蒜提取物、16.7%的大蒜渣及16.7%的大蒜肥时,均会引起大豆幼苗烧苗。为了探讨大蒜废弃物防治农作物病害的效果,确定大蒜提取物等在不伤害农作物的前提下用于抑制病原菌的合理用量,本研究进行了大蒜提取物抑菌效果、抑菌活性及大蒜提取物和大蒜渣等在土壤环境中对土传病原菌——大豆尖孢镰刀菌的抑制试验,以期为大蒜废弃物作为生物农药的广泛应用和深入研究大蒜有效成分的抑菌能力提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

江苏南京市售白皮大蒜,江苏徐州沃尔地化工公司研发的大蒜-氨基酸肥料。供试菌株为大豆尖孢镰刀菌、油菜菌核病菌、大豆细菌性斑点病菌和水稻白叶枯病菌,均由南京农业大学植物保护学院分子植物病理学与生防实验室提供,其中大豆尖孢镰刀菌为土传病原菌。供试两种真菌病原菌采用PDA培养基,25℃培养;两种细菌病原菌分别采用NA培养基和KB培养基,28℃培养。

1.2 试验方法

1.2.1 大蒜提取物的制备

大蒜鳞茎提取物的制备:选取新鲜的大蒜鳞茎,剥皮后准确称量50 g鳞茎,75%酒精表面消毒,用捣蒜器捣碎后加入100 mL无菌水,灭菌纱布过滤将蒜汁与蒜渣分离,分别4℃保存备用。得到的蒜汁即为使用大蒜鳞茎质量浓度为 $500 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的大蒜提取母液。此过程所用器具均经75%酒精表面消毒,并在超净工作台上进行。母液中加入不同比例的无菌水,得到如下质量浓度的提取液:500、400、300、250、200、150、100、50 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。保存备用。

1.2.2 大蒜提取物对病原菌的抑菌效果:纸碟法

平板菌落的制备:用打孔器从培养3 d的大豆尖孢镰刀菌和油菜菌核病菌平板上打取直径为8 mm

的菌块,置于事先配制好的 PDA 平板中央,每皿 1 片,置于 25 ℃恒温培养箱中黑暗培养 3 d 后,4 ℃保存备用。

摇瓶制备菌液:用打孔器从大豆尖孢镰刀菌和油菜菌核病菌平板菌落上打取直径 8 mm 的菌块,置于灭菌的装有 100 mL 液体 PDA 培养基的 250 mL 三角瓶中,25 ℃、120 r·min⁻¹ 培养 7 d,4 ℃保存备用;大豆细菌性斑点病菌和水稻白叶枯病菌用接种环从有菌的平板挑选单菌落,分别置入灭菌的装有 100 mL 液体 KB 或 NA 培养基的 250 mL 三角瓶中,28 ℃、120 r·min⁻¹ 培养 3 d,4 ℃保存备用。

滤纸片法测定抑菌效果:用打孔器将滤纸打成直径为 10 mm 的圆纸片,将其灭菌,置于配制好的不同浓度的大蒜鳞茎提取物中浸泡 30 min。同时取摇瓶培养的病原菌 200 μL 于 9 cm 的培养基上混菌制成含菌平板。取出滤纸片沥干,放在含菌平板上,每皿 3 个滤纸片,每处理 3 皿。以滤纸片浸入无菌水为对照 CK。真菌 25 ℃、细菌 28 ℃黑暗培养,1~3 d 后采用十字交叉法量取抑菌圈直径。

1.2.3 大蒜提取物对病原真菌的抑菌活性:菌丝生长速率测定法

含大蒜鳞茎提取物培养基的制备:配含水 80%的 PDA 培养基(马铃薯 200 g,琼脂 20 g,葡萄糖 20 g,水 800 mL)。将不同质量浓度提取液加入到已融化并冷却到 50 ℃左右的 80%的 PDA 培养基中,充分摇匀,培养基与提取液体积比为 8:2,然后分别倒入直径为 9 cm 的培养皿中,制备含提取物浓度分别为 100、80、

60、50、40、30、20 mg·mL⁻¹ 和 10 mg·mL⁻¹ 的平板。以加等量无菌水的 PDA 平板为对照。

抑菌活性测定:用打孔器从大豆尖孢镰刀菌和油菜菌核病菌的平板菌落上打取直径为 8 mm 的菌块,置于事先配制好的含不同质量浓度(10~100 mg·mL⁻¹)大蒜提取物的 PDA 平板中央,每皿 1 片,每处理 3 皿,置于 25 ℃恒温培养箱中黑暗培养,3 d 后测量菌落扩展直径。采用十字交叉法测定菌落的生长直径,计算提取物对菌丝生长的抑制率。

抑菌率(%)=[(对照皿菌落直径-处理皿菌落直径)/对照皿菌落直径]×100%

预试验发现,培养基上提取物浓度为 40 mg·mL⁻¹ 时,油菜菌核病菌完全不生长,故减小提取物的浓度测定对油菜菌核病菌的抑菌活性。

1.2.4 大蒜提取物、渣、肥对土壤中大豆尖孢镰刀菌的抑制作用

大豆尖孢镰刀菌孢悬液的制备:将 1.2.2 中摇瓶培养的大豆尖孢镰刀菌经单层纱布过滤,测定滤液中分生孢子浓度,将孢子浓度调节为 1.65×10⁸ cfu·mL⁻¹,备用。

土壤过 2 mm 筛,分装到 50 mL 烧杯中,每杯 20 g,用 8 层纱布封口,灭菌 30 min 后 4 ℃保存备用。按表 1 所列各物质的施用量,对供试土壤进行处理,每处理重复 3 次。其中,A 处理为对照。

土壤处理后,对各处理的土壤中所含目标病原菌的数量进行测定。具体方法是:用玻璃棒充分搅匀,准确称量杯内土壤体系的总质量。此重量的 1/20 为检

表 1 不同处理土壤中加入的物质剂量及试验物质的含量
Table 1 The dosage and the content of garlic extracts, garlic slag, garlic fertilizer in the soil with different treatments

处理 Treatment	加入物质的剂量 Dosage of added substance					土壤中试验物质的含量 Amount of the test substance in the soil		
	菌液/mL Bacilli	无菌水/mL Sterile water	大蒜提取物母液/mL Garlic extract Liquor	大蒜渣/g Garlic slag	大蒜肥/g Garlic fertilizer	大蒜提取物浓度/mL·g ⁻¹ Garlic extract concentration	大蒜渣浓度/% Garlic slag	大蒜肥浓度/% Garlic fertilizer
A	2	3						
B0	2	3	0.1			0.005		
B1	2	2	1			0.05		
B2	2	1	2			0.1		
B3	2		3			0.15		
C0	2	3		0.1			0.5	
C1	2	3		1			5	
C2	2	3		3			15	
C3	2	3		5			25	
D1	2	3			1			5
D3	2	3			5			25

测时的理论取样重量,25℃培养。搅拌好立即取样检测,即为第 0 d 计数,此后每 3 d 检测。每次检测前 1 d 加入无菌水补足重量。

土壤中目标病原菌的分离和计数采取土壤倍数稀释法:准确称量 1 份土样后,以无菌水为溶剂,用 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 0.2×10^{-3} 稀释法稀释 5 000 倍,采用 PDA 平皿混菌,每皿加样 200 μL ,3 个重复,培养计算每皿的菌落形成单位,进而按下式计算每份土样含大豆尖孢镰刀菌孢子数量:

大豆尖孢镰刀菌孢子数量(个)=每皿的菌落形成单位 $\times$ 理论取样重量 $\times 5\times 5\,000$ /实际取样重量

2 结果

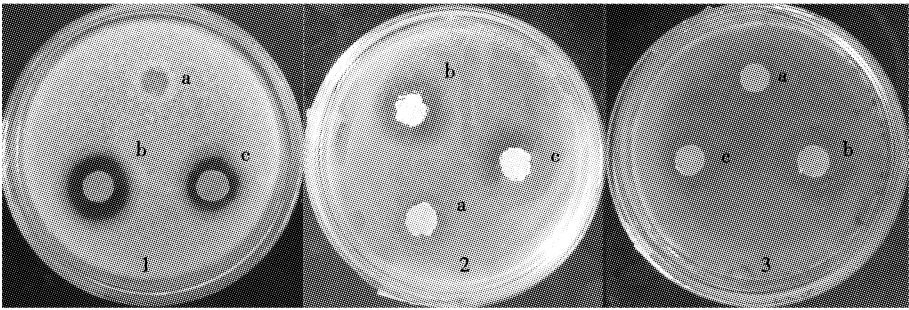
2.1 纸碟法测定大蒜提取物对病原菌的抑菌效果

采用滤纸片法测定大蒜提取物的抑菌效果,选取 4 种微生物检测大蒜提取物的抑菌活性。油菜菌核病菌和大豆尖孢镰刀菌为真菌,大豆细菌性斑点病菌和

水稻白叶枯病菌为细菌,由于油菜菌核病菌不能产生分生孢子,无法摇瓶培养,因此得到大蒜提取物对大豆尖孢镰刀菌、大豆细菌性斑点病菌和水稻白叶枯病菌的抑菌结果,见图 1。

3 种菌均在含高、低两种浓度大蒜提取物的滤纸周围产生大小不等的抑菌圈,与对照有明显差别,大蒜提取物的浓度越大,抑菌圈越大。其中大豆尖孢镰刀菌受大蒜提取物的抑制效果极为明显。采用交叉法分别量取 3 种病原菌的抑菌圈直径,大豆尖孢镰刀菌培养 3 d 后测量,另外两种细菌培养 1 d 后测量。结果见表 2。

大豆尖孢镰刀菌抑菌圈测定结果中,大蒜提取物浓度在 $100\sim 500\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内时,随着浓度的升高,抑菌圈直径增大。当浓度小于等于 $25\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,对大豆尖孢镰刀菌孢子生长无抑制,与对照无差异;当浓度为 $100\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,抑菌圈直径与对照已有显著差异;当浓度达 $500\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,抑菌圈直径



1 号为大豆尖孢镰刀菌,2 号为大豆细菌性斑点病菌,3 号为水稻白叶枯病菌
a 为对照,b 和 c 分别为含高、低两种浓度大蒜提取物的处理
1-*Fusarium oxysporum* f.sp.*tracheiphilum*; 2-*Pseudomonas.syringae* pv.*glycinea*; 3-*Xanthomonas oryzae* pv.*oryzae*[*Ishiyama*]*Dye,Xoo*
a-CK; b,c-Treatments with high and low concentration of garlic extract, respectively

图 1 大蒜鳞茎提取物对 3 种微生物抑菌效果

Figure 1 The effects of inhibition of garlic bulb extracts on the three kinds of microorganisms

表 2 不同浓度大蒜提取物对 3 种微生物的抑菌效果

Table 2 The effects of inhibition of garlic bulb extracts with different concentrations on the three microorganisms

大蒜提取物浓度/ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ Garlic extract concentration	抑菌圈直径 Diameter of inhibition zone/mm		
	大豆尖孢镰刀菌 <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>tracheiphilum</i>	大豆细菌性斑点病菌 <i>Pseudomonas.syringae</i> pv. <i>glycinea</i>	水稻白叶枯病菌 <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> [<i>Ishiyama</i>] <i>Dye,Xoo</i>
500	29.67 $\pm$ 7.67e	30.33 $\pm$ 1.67e	40.50 $\pm$ 1.50d
400	25.17 $\pm$ 5.67de	25.33 $\pm$ 1.33d	36.33 $\pm$ 1.67c
300	20.67 $\pm$ 4.67cd	24.67 $\pm$ 1.33d	29.83 $\pm$ 0.33b
200	18.00 $\pm$ 1.50c	21.00 $\pm$ 1.00c	0a
100	11.33 $\pm$ 1.33b	14.00 $\pm$ 1.00b	0a
25	0a	-	-
0	0a	0a	0a

注:表内数列后相同字母者表示在方差分析中无显著性差异($P>0.05$)。
Note: Values within the same column followed by same letter are not significantly different at $P_{0.05}$ level.

达到最大,平均为 29.67 mm。

大豆细菌性斑点病菌抑菌圈测定结果中,提取物浓度在 $100\sim 500\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内时,随着浓度的升高,抑菌圈直径增大。当浓度为 $100\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,抑菌圈直径与对照有显著差异;当浓度达 $500\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,抑菌圈直径达到最大,平均为 30.33 mm。

水稻白叶枯病菌抑菌圈测定结果中,大蒜提取物浓度小于等于 $200\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,对水稻白叶枯病菌生长无抑制,由此可见水稻白叶枯病菌对大蒜提取物不如大豆尖孢镰刀菌和大豆细菌性斑点病菌敏感。提取物浓度在 $300\sim 500\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内,随着浓度的升高,抑菌圈直径增大。当浓度为 $300\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,抑菌圈直径与对照有显著差异;当浓度达 $500\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,抑菌圈直径达到最大 40.50 mm。

2.2 菌丝生长速率测定法测定大蒜提取物对病原真菌的抑菌活性

抑菌活性试验结果发现,在含大蒜提取物的 PDA 培养基上,两种真菌菌丝的生长都受到抑制,随着大蒜提取物浓度的升高,菌落直径逐渐减小。见图 2。

大豆尖孢镰刀菌在对照培养基上生长出的菌落较大,菌丝茂盛,与高浓度大蒜提取物的培养基上的菌落相比菌落直径差别极为显著:对照处理的直径达到 40.5 mm,含提取物 $100\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的处理直径为 0。油菜菌核病菌在空白对照培养基上生长出的菌落与在高浓度大蒜提取物的培养基上的差别也较明显:对照处理的直径达到 52.67 mm,含提取物 $30\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的处理直径为 0。含高浓度提取物 ($100\text{ mL}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的培养基上,两种真菌都完全不生长,可见高浓度大蒜提取物能完全抑制两种真菌菌丝的生长。培养 3 d 后用十字交叉法测量菌落直径,结果见图 3。

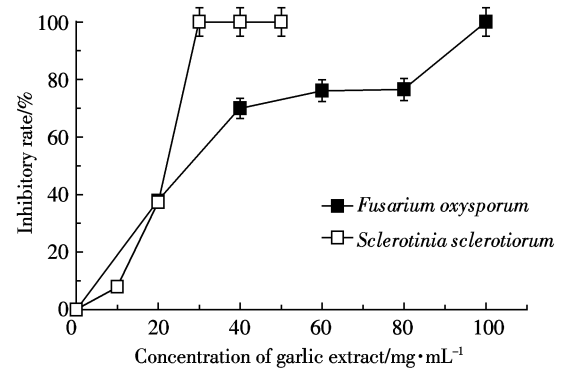


图 3 大蒜提取物对两种真菌菌丝的抑制效应曲线

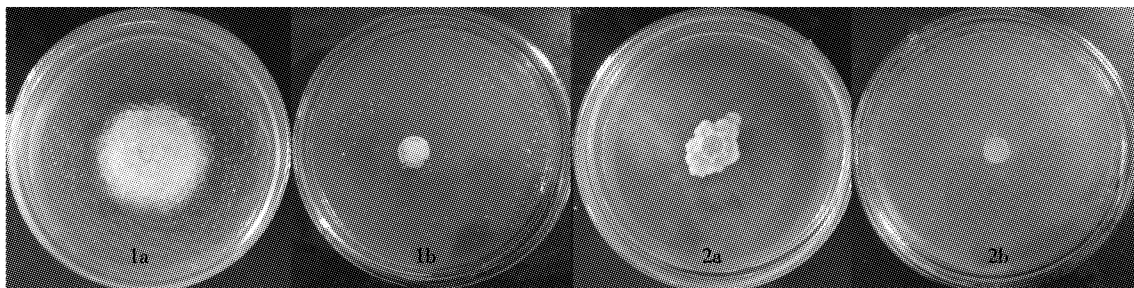
Figure 3 The curve of inhibitory effects of garlic bulb extracts on the growth of the two kinds of fungi

大豆尖孢镰刀菌在含大蒜提取物 $20\sim 100\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的培养基上,菌丝的生长均受到抑制,菌落直径随着提取物浓度的增加而减小;培养基中大蒜提取物浓度为 $20\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,抑菌率为 37.85%,菌落直径与对照差异已显著;提取物浓度分别为 40、60、80 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,抑菌率分别达到 69.75%、76.12%和 76.54%。当浓度达到 $100\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时则完全抑制了病菌的菌丝生长。

大蒜提取物对油菜菌核病菌菌丝生长的抑制情况为:在供试的 $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度下,该提取物对病菌菌丝即表现出抑制作用,抑制率为 7.92%。随着大蒜鳞茎提取物浓度的增加,抑菌作用增强,病菌菌落直径逐渐减小。提取物浓度为 $20\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,对菌丝生长的抑制率达到 37.35%;当浓度为 $30\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,提取物对菌丝生长的抑制率达到 100%。

2.3 大蒜提取物、渣、肥对土壤中大豆尖孢镰刀菌的抑制结果

向灭菌土壤中分别加入 PDA 摇瓶培养的大豆尖



1b 为大豆尖孢镰刀菌在高浓度大蒜提取物的培养基上生长出的菌落,1a 为对照;

2b 为油菜菌核病菌在高浓度大蒜提取物的培养基上生长出的菌落,2a 为对照

1b-Colony of *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* on the medium of high garlic extract content, 1a-CK;

2b-Colony of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary on the medium of high garlic extract content, 2a-CK

图 2 大蒜提取物对大豆尖孢镰刀菌和油菜菌核病菌菌丝的抑制效应

Figure 2 The inhibitory effects of garlic bulb extracts on *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* and *Sclerotinia sclerotiorum*

孢镰刀菌悬液及不同浓度的大蒜提取物、大蒜渣和大蒜肥, 25℃培养。每隔 3 d 用稀释平板计数法统计菌落形成单位以检测单位质量土壤中的孢子数, 结果见表 3。第 6 d 和第 9 d 由于土壤中孢子浓度增加, 为了方便计数, 检测时提高了稀释倍数。

表 3 不同处理下每份土样中的大豆尖孢镰刀菌孢子数

Table 3 The number of spores of *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* in each plate with different treatments

处理 Treatment	每份土样检测到的孢子数/个 Number of spores detected in each soil sample			
	0 d	3 d	6 d	9 d
A	5.79E+06efg	3.71E+06b	9.17E+06c	1.14E+07b
B0	5.88E+06fg	3.48E+06b	7.86E+06b	1.15E+07b
B1	5.16E+06def	0a	0a	0a
B2	1.99E+06a	4.99E+06c	0a	0a
B3	2.77E+06b	0a	0a	0a
C0	4.99E+06de	0a	9.91E+06d	1.17E+07b
C1	3.75E+06c	7.36E+04a	0a	0a
C2	5.24E+06def	0a	0a	0a
C3	3.32E+06bc	0a	0a	0a
D1	4.67E+06d	4.64E+06c	9.42E+06c	1.63E+07c
D3	6.40E+06g	0a	0a	0a

注: 表内数列后相同字母者表示在方差分析中无显著性差异 ($P>0.05$)。

Note: Values within the same column followed by same letter are not significantly different at $P_{0.05}$ level.

培养当天, 各处理都能检测到大豆尖孢镰刀菌孢子, 但不同处理下的病原菌孢子数量有显著差异。第 3 d 时, 除 B0、B2、D1 处理外, 其他处理均显著小于对照。培养 6 d 时, 含高浓度大蒜提取物、大蒜渣、大蒜肥的处理无菌落生长, 与对照和其他低浓度的处理差异显著。到第 9 d 时, 浓度高的处理仍然无菌生长, B 组中浓度为含大蒜提取物 0.05、0.1 mL·g⁻¹ 和 0.15 mL·g⁻¹ 的土壤均检测不到大豆尖孢镰刀菌孢子, 对照组每份土壤中有可检测到的大豆尖孢镰刀菌孢子 1.14×10⁷ 个。含大蒜提取物 0.005 mL·g⁻¹ 的土壤检测到大豆尖孢镰刀菌孢子 1.15×10⁷ 个, 与对照相近。C 组中含大蒜渣 5%、15% 和 25% 的土壤均检测不到大豆尖孢镰刀菌孢子, 含大蒜渣 0.5% 的处理每份土样中有大豆尖孢镰刀菌孢子 1.17×10⁷ 个, 与对照差别不大。D 组中含大蒜肥 25% 的土壤中检测不到大豆尖孢镰刀菌孢子, 而含大蒜渣 5% 的土壤检测到的孢子数显著高于对照, 每份土样中有大豆尖孢镰刀菌孢子 1.63×10⁷ 个。

3 讨论

3.1 纸碟法测定大蒜提取物对病原菌的抑菌效果

大豆尖孢镰刀菌抑菌圈测定结果中浓度达 500 mg·mL⁻¹ 时, 抑菌圈直径达到最大, 平均为 29.67 mm, 与杨光等的大蒜提取物抑制黑曲霉产生的最大抑菌圈为 29.3 mm 结果相近^[19]。

大蒜提取物对 3 种微生物的抑菌试验结果进一步证实了 Uchida Y 等的结论, 大蒜提取物中的主要有效成分大蒜素因为能与微生物生长繁殖必需的巯基相结合, 使巯基酶失活, 从而抑制微生物生长^[20-21]。因此, 大蒜提取物有广泛的杀菌作用, 且对假单胞菌等的抑菌效果随着浓度的增加而愈加明显。本试验中, 大蒜提取物对大豆尖孢镰刀菌抑制效果较显著, 但与程智慧等关于大蒜鳞茎粗提物对黄瓜枯萎病菌的抑菌效果的试验相比, 对供试菌株的最小抑菌浓度更高。产生这种差异可能与大蒜的品种不同、大蒜有效成分的提取方法不同、两种真菌对大蒜提取物的抗性不同等有关。当提取物浓度为 200 mg·mL⁻¹ 时, 能抑制大豆细菌性斑点病菌却不能抑制水稻白叶枯病菌, 可见不同的病原菌对该提取物的敏感性不同。

3.2 菌丝生长速率测定法测定大蒜提取物对病原真菌的抑菌活性

两种供试病原真菌在含大蒜提取物的 PDA 培养基上生长与对照相比, 菌丝的生长都受到抑制。提取物浓度在 0~100 mg·mL⁻¹ 范围内时, 随着浓度的升高, 大豆尖孢镰刀菌的菌丝生长受到的抑制增强; 提取物浓度在 0~30 mg·mL⁻¹ 范围内时, 随着浓度的升高, 油菜菌核病菌菌落的生长受到的抑制增强。可见含较高浓度的大蒜提取物的 PDA 培养基能完全抑制菌丝的生长。培养基中大蒜提取物浓度达 100 mg·mL⁻¹ 时大豆尖孢镰刀菌的菌丝生长的抑制率达到 100%, 而只需 30 mg·mL⁻¹ 就能对油菜菌核病菌菌丝生长的抑制率达 100%。油菜菌核病菌比大豆尖孢镰刀菌对大蒜提取物的抑制更为敏感。对油菜菌核病菌菌丝生长的抑制效应结果与程智慧等研究结果中质量浓度为 20 mg·mL⁻¹ 的大蒜提取物对黄瓜枯萎病菌孢子萌发的抑制率达 92.6% 较为接近。

3.3 大蒜提取物、渣、肥对土壤中大豆尖孢镰刀菌的抑制结果

B 组中加入较高浓度大蒜汁的处理明显比对照和加入较低浓度大蒜汁的低, 推测是由于平皿培养过程中, 大蒜提取物中的有效成分发挥了一定的抑菌效

果。培养到第3 d时,估计是由于大豆尖孢镰刀菌还未能适应土壤环境,各处理中孢子的浓度较3 d前都有不同程度的降低。

培养9 d时,含大蒜肥5%的土壤检测的平皿中生长菌落数显著高于对照菌落数,推测是因为较高浓度的大蒜肥能抑制病原菌,较低浓度的不能抑制病菌,而加入的肥料又在一定程度上改善了土壤的环境,使之更有利于病原菌生长产孢。粗略估计加入25%大蒜肥的抑菌能力相当于加入了5%的大蒜渣,能有效抑制土壤中的大豆尖孢镰刀菌。

试验证实在有菌土壤中,大蒜提取物能有效抑制大豆尖孢镰刀菌的定殖,并确定了9 d内不同浓度提取物的抑菌效果。含大蒜提取物达 $0.05 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 的土壤、含大蒜渣达5%的土壤和含大蒜肥25%的土壤均能抑制大豆尖孢镰刀菌。因此,大蒜制品作为生物肥料或生物农药应用在生产中,不仅能合理利用大蒜废弃物,还能减少土壤中的病原菌,清洁土壤。

尽管大蒜提取物等对尖孢镰刀菌的抑菌作用随浓度的升高而增强,但在前期盆栽试验中发现培养基质中含有 $0.2 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 大蒜提取物、16.7%的大蒜渣及16.7%的大蒜肥会对大豆幼苗造成伤害。结合上述土壤中的抑菌试验结果,推断大蒜提取物的使用在 $0.05 \sim 0.2 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 之间、大蒜渣的使用在5%~16.7%之间较好,大蒜肥的使用应低于16.7%。

4 结论

对供试两种病原细菌的抑菌效果试验中,质量浓度分别为 $100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $300 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的大蒜提取物对大豆细菌性斑点病菌和水稻白叶枯病菌有抑制作用;对真菌的抑制试验中,浓度在 $100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的大蒜提取物能有效抑制大豆尖孢镰刀菌孢子的萌发,提取物浓度分别达 $100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $30 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时能完全抑制大豆尖孢镰刀菌和油菜菌核病菌菌丝生长。

为了研究大蒜提取物及大蒜渣、大蒜肥等在土壤环境中是否仍具有抑菌能力,在防治土传病害中是否有开发价值,做了大蒜提取物、渣、肥对大豆尖孢镰刀菌的抑制试验,结果表明,土壤中含大蒜提取物达 $0.05 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 、含大蒜渣达5%和含大蒜肥25%均能抑制大豆尖孢镰刀菌。

参考文献:

[1] 李祎君,王春乙,赵 蓓,等.气候变化对中国农业气象灾害与病虫害的影响[J].农业工程学报,2010,26(增刊1):263-271.

- LI Yi-jun, WANG Chun-yi, ZHAO Bei, et al. Effects of climate change on agricultural meteorological disaster and crop insect diseases [J]. *Transactions of the CSAE*, 2010, 26(Suppl1): 263-271.
- [2] 魏金星.油菜菌核病的发生现状及防治[J].河南农业,2011(1):18.
WEI Jin-xing. The present situation of occurrence of *Sclerotinia sclerotiorum* disease and its prevention[J]. *Henan Agriculture*, 2011(1):18.
- [3] 祝利霞,张冬晓,傅廷栋,等.20年来中国冬油菜新品种产量和抗病性状分析[J].中国农学通报,2010,26(24):375-380.
ZHU Li-xia, ZHANG Dong-xiao, FU Ting-dong, et al. Analysis of yield and disease resistance traits of new winter rapeseed variety in the past twenty years in China[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2010, 26(24):375-380.
- [4] 骆海玉,邓业成,秦 卉,等.植物提取物及杀菌剂对水稻白叶枯病菌的抑菌活性[J].作物杂志,2010,6:87-90.
LUO Hai-yu, DENG Ye-cheng, QIN Hui, et al. The activity of inhibition of plant extracts and bactericide on *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* [J]. *Journal of Crops*, 2010, 6:87-90.
- [5] 徐成荣,王 嫩,李梦云.水稻白叶枯病发生流行原因及综合防治对策[J].农家之友,2010,11:23-24.
XU Cheng-rong, YU Nen, LI Meng-yun. The reasons for the occurrence of *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* disease and its synthetical prevention [J]. *Friend of Farmers*, 2010, 11:23-24.
- [6] 赵奎军,于振民.绥化市大豆霜霉病和细菌性斑点病调查报告[J].大豆科技,2008,7(25):6-7.
ZHAO Kui-jun, YU Zhen-min. Report of frost mold disease and bacterial spot disease of soybean in the city of Suihua[J]. *Soybean Science*, 2008, 7(25):6-7.
- [7] 刘文志,王北兰,李 鹏,等.生物制剂对大豆根腐病菌的抑制及对大豆幼苗生长的影响[J].现代化农业,2010,12:21-24.
LIU Wen-zhi, WANG Bei-lan, LI Peng, et al. Effects of inhibition of biological preparation on soybean root mold pathogenic bacteria and its effects on soybean's growth[J]. *Modern Agriculture*, 2010, 12:21-24.
- [8] 陈海军,李 英.大豆根腐病的发病原因及防治方法 [J].现代农业,2010,4:30-33.
CHEN Hai-jun, LI Ying. The reasons for the occurrence of soybean root mold disease and its prevention[J]. *Modern Agriculture*, 2010, 4:30-33.
- [9] 陈志杰,张 锋,张淑莲,等.温室黄瓜土传病害流行因素及环境友好型防治技术对策[J].农业环境科学学报,2006,25(增刊):697-700.
CHEN Zhi-jie, ZHANG Feng, ZHANG Shu-lian, et al. Epidemic factors of soil-borne diseases of cucumber and environment-friendly control technique under sunlight greenhouse in loess hilly region[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2006, 25(Suppl): 697-700.
- [10] 胡秋辉,胡 勇.大蒜、洋葱清洁化生产技术及其深加工技术现状与展望[J].世界农业,2008,3(347):56-58.
HU Qiu-hui, HU Yong. The present situation and prospect of clean produce technology of garlic and onion[J]. *World Agriculture*, 2008, 3(347):56-58.
- [11] 杜木英,吴雪琴,侯大军,等.三种植物提取液的抑菌作用研究[J].四川食品与发酵,2003(3):5-8.
DU Mu-ying, WU Xue-qin, HOU Da-jun, et al. Studies on the inhibition activities of extracts of balsam pear, garlic and capsicum [J].

- Sichuan Food and Fermentation*, 2003(3):5-8.
- [12] 周铁军, 张荻华, 刘亚萍, 等. 大蒜液杀灭微生物效果及影响因素观察[J]. 中国消毒学杂志, 2004, 21(3):186-188.
- ZHOU Tie-jun, ZHANG Di-hua, LIU Ya-ping, et al. Observation on germicidal efficacy of garlic solution and its influencing factors[J]. *Chinese Journal of Disinfection*, 2004, 21(3):186-188.
- [13] 朱永辉, 刘云英, 张长初. 蒜素的合成及应用[J]. 山东食品发酵, 2008, 151:39-42.
- ZHU Yong-hui, LIU Yun-ying, ZHANG Chang-chu. Synthesis and application of allicin [J]. *Shandong Food Fermentation*, 2008, 151:39-42.
- [14] 俞超芹, 凌昌全, 潘瑞萍, 等. 大蒜素诱导人T淋巴细胞白血病细胞株凋亡的实验研究[J]. 中医杂志, 1999, 40(5):307-308.
- YU Chao-qin, LING Chang-quan, PAN Rui-ping, et al. Experimental study of allicin-induced cell apoptosis of human T lymphocyte[J]. *Chinese Traditional Medicine*, 1999, 40(5):307-308.
- [15] 房兴堂, 张子峰, 赵雪锋, 等. 饲料防霉剂效果检测与天然防霉剂开发[J]. 兽药与饲料添加剂, 2004, 9(6):20-23.
- FANG Xing-tang, ZHANG Zi-feng, ZHAO Xun-feng, et al. Determination of effects of feed fungicide and development of natural fungicide [J]. *Veterinary Drugs and Feed Additives*, 2004, 9(6):20-23.
- [16] 大蒜精油植物型农药获得成功[J]. 今日农药, 2009(1):12.
- Successful garlic oil pesticide[J]. *Today Pesticide*, 2009(1):12.
- [17] 程智慧, 宋 莉, 孟焕文. 大蒜鳞茎粗提物对黄瓜枯萎病的抑菌作用和防病效果[J]. 西北农林科技大学学报, 2008, 36(5):113-118.
- CHENG Zhi-hui, SONG Li, MENG Huan-wen. Study on the effects of garlic bulb crude extracts on inhibition of *Fusarium oxysporum*(Schl.) f. sp. *Cucumerinum* Owen and disease control[J]. *Journal of Northwest A & F University(Nat Sci Ed)*, 2008, 36(5):113-118.
- [18] 高景昌, 李爱军. 大蒜浸提液在农业上的应用 [J]. 农业新技术新方法, 1997, 64(1):31-32.
- [19] 杨 光, 欧阳涟, 陈 君, 等. 大蒜乙醇提取液抑菌初步研究[J]. 中国酿造, 2011, 1(226):61-62.
- YANG Guang, OUYANG-Lian, CHEN Jun, et al. Antimicrobial activities of garlic extract by alcohol[J]. *China Brewing*, 2011, 1(226):61-62.
- [20] Uchida Y, Takahashi T, Sato N. The characteristics of the antibacterial activity of garlic[J]. *Jpn J Antibiot*, 1975, 28:638-642.
- [21] 宋卫国, 李宝聚, 刘开启. 大蒜化学成分及其抗菌活性机理研究进展[J]. 园艺学报, 2004, 31(2):263-268.
- SONG Wei-guo, LI Bao-ju, LIU Kai-qi, et al. Advances in research on chemical components in garlic (*Allium sativum*) and mechanism of their inhibitory reaction with pathogens in plants[J]. *Acta Horticulture Sinica*, 2004, 31(2):263-268.