

茶树油对植物病原真菌的抑制作用

陶凤云, 赵伟*, 林强 (北京联合大学生物化学工程学院, 北京 100023)

摘要 [目的] 测定茶树油对植物病原真菌的抑制作用。[方法] 采用菌丝生长速率法测定茶树油对水稻恶苗菌、尖孢镰刀菌和水稻纹枯菌的最小抑菌浓度。[结果] 茶树油对3种测试菌的菌丝生长均具有显著的抑制作用, 最小抑菌浓度分别为1.000%、0.750%和0.125%。[结论] 茶树油对3种植物病原真菌菌丝生长的抑制作用显著, 为进一步开发农用杀菌剂奠定了基础。

关键词 茶树油; 植物病原真菌; 抑制作用

中图分类号 S476+.9 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)34-15055-02

Inhibition Effects of Tea Tree Oil on the Growth of Phytopathogenic Fungi

TAO Fengyun et al (Biochemical Engineering College of Beijing Union University, Beijing 100023)

Abstract [Objective] The research aimed to determine the inhibition effects of tea tree oil on the phytopathogenic fungi. [Method] By using mycelium growth rate method, the minimal inhibitory concentrations (MC) of tea tree oil on *Fusarium moniliforme*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* were determined. [Result] Tea tree oil had significant inhibition effects on the mycelium growth of three kinds of test fungi, with MC of 1.000%, 0.750% and 0.125% respectively. [Conclusion] Tea tree oil had significant inhibition effects on the mycelium growth of three kinds of plant fungi and the results laid the foundation for developing the agricultural fungicide further.

Key words Tea tree oil; Phytopathogenic fungi; Inhibition effect

茶树油(Tea Tree Oil, TTO)是由桃金娘科(Myrtaceae)白千层属(Maleuca)灌木树种互叶白千层(*Maleuca alternifolia*)的新鲜枝叶经水蒸气蒸馏得到的芳香精油。其组成十分复杂,是100多种组分的混合物^[1]。近年来对茶树油杀菌活性的研究表明,茶树油中多种组分具有协同杀菌作用^[2-3],主要以膜破坏剂的形式破坏微生物膜结构的完整性进而影响膜功能,具有广谱的抗细菌^[4]、清除耐药菌^[5]、抗真菌^[6]、抗病毒^[7]等活性,在日化、医药等领域具有广阔的应用前景^[8]。但在农业方面的应用报道,特别是其作为病害抑制剂的研究报道很少。笔者采用菌丝生长速率法测定茶树油对3种常见植物致病真菌水稻恶苗菌、尖孢镰刀菌和水稻纹枯菌的最小抑菌浓度,为研制新型植物病害抑制剂提供依据。

1 材料与方法

1.1 设备、菌种及试剂 LS-835L型立式压力蒸汽灭菌锅(江阴江滨医疗设备厂),SWCJB型净化工作台(上海新苗医疗器械制造有限公司),LRH250型生化培养箱(上海一恒科技有限公司),THZ-D型台式恒温振荡器(江苏省太仓市实验设备厂)。

水稻恶苗菌(*Fusarium moniliforme*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、水稻纹枯菌(*Rhizoctonia solani*)购于中国科学院微生物研究所。

茶树油(医药级,广西南方万家辉种植有限公司),其质量符合国际标准(ISO1730:2004);其他试剂均为市售分析纯。

1.2 方法

1.2.1 不同浓度加药培养基的制备。量取4 mL的天然茶树油,加入0.1 mL的吐温80,补蒸馏水至100 mL,混匀,配制成4%(V/V)茶树油溶液。用二倍稀释法将该溶液连续稀释。分别移取不同浓度的茶树油溶液50 mL于无菌三角瓶中,然后倒入55 mL的马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)50 mL,使各三角瓶中茶树油终浓度达到试验要求,迅速混匀后,分别倒入90 mm的无菌培养皿中,每皿约15 mL,制成薄厚均匀的不同

药物浓度的测试平板,并制备不含药物的培养基平板作为菌丝生长的阳性对照组。

1.2.2 菌饼的制备和移植。用接种环从各供试的植物病原真菌(水稻恶苗菌、尖孢镰刀菌和水稻纹枯菌)菌种保存管斜面上选取典型的菌落,接种到PDA培养基上,在26℃生化培养箱中培养48 h,得到生长良好的植物真菌。用8 mm的打孔器沿菌落边缘打出若干个相同大小的菌饼。将菌饼分别接种于不同浓度的含药PDA培养基上,菌丝面向下,每皿中央放1块菌饼,放入26℃温箱中培养。每种浓度药物每个菌种接种3皿,取3次试验平均值,并以无药培养基接种相同菌种作为阳性对照,加药培养基不接菌作为阴性对照。

1.2.3 真菌生长量的测量及抑制率的计算。真菌的生长量用培养皿中菌落的面积减去初始接种菌饼的面积表示。接种后每隔24 h检测1次,十字交叉法量取菌落直径(mm),每块培养皿取3次测量的平均值,每个药物每种菌种取3块培养皿的平均值。水稻恶苗菌和尖孢镰刀菌连续检测7 d,水稻纹枯菌因生长速度快,故连续检测5 d。根据测量结果计算真菌生长抑制率,计算公式为:菌丝生长抑制率(%)=[(对照皿中菌落直径-初始接种菌饼直径)-(处理皿中菌落直径-初始接种菌饼直径)]²/(对照皿中菌落直径-初始接种菌饼直径)²×100。最小抑菌浓度(MC)定义为:在连续7 d(5 d)的试验观察中,能100%抑制测试菌菌丝生长的最低茶树油浓度。所有数据均表示为3次试验的平均值±标准差。

2 结果与分析

茶树油对水稻恶苗菌、尖孢镰刀菌及水稻纹枯菌的菌丝生长均具有显著的抑制作用。茶树油的MC因菌种而异。

2.1 不同浓度茶树油对水稻恶苗菌菌丝生长的影响由图1可见,在连续7 d的试验观察中,1.000%茶树油均能100%抑制水稻恶苗菌的菌丝生长;0.500%茶树油在试验最初的3 d内能100%抑制水稻恶苗菌的菌丝生长,以后随着培养时间的延长开始有少量菌丝生长;0.250%茶树油的平板在试验的第1天无菌丝生长,从第2天起,有少量菌丝生长;第7天试验终点时,0.250%和0.500%茶树油对水稻恶苗菌的抑制率分别达到71.5%和85.1%。

基金项目 北京联合大学生物化学工程学院资助项目。

作者简介 陶凤云(1970-),女,北京人,在读博士,讲师,从事天然产物生物活性研究。*通讯作者。

收稿日期 2008-10-06

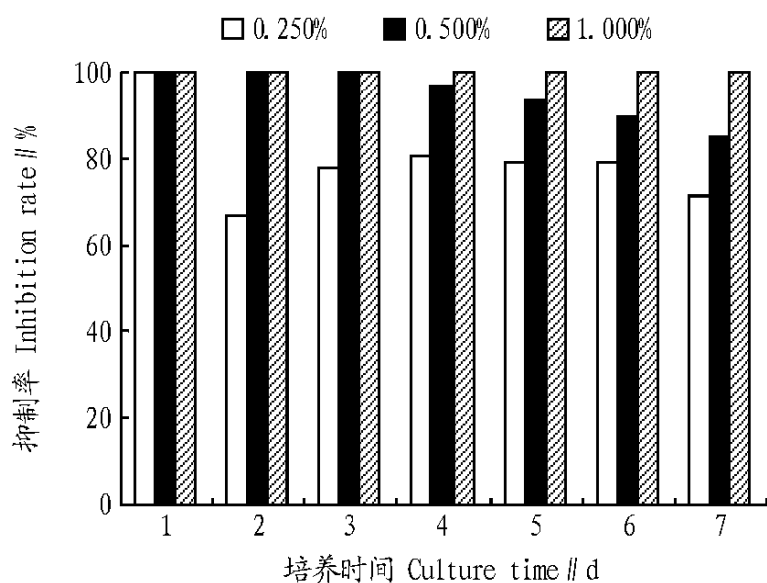


图1 不同浓度茶树油对水稻恶苗菌菌丝生长的抑制率

Fig.1 The inhibition rate of tea tree oil at different concentrations on the mycelial growth of *Fusarium moniliforme*

2.2 不同浓度茶树油对尖孢镰刀菌菌丝生长的影响 茶树油对尖孢镰刀菌的最小抑菌浓度低于水稻恶苗菌。由图2可见,在连续7 d的试验观察中,0.750%茶树油均能100%抑制尖孢镰刀菌的菌丝生长;0.500%茶树油在试验最初的4 d内能100%抑制尖孢镰刀菌的菌丝生长,从第5天起开始有少量菌丝生长;0.250%和0.125%茶树油的平板在试验最初的2 d内均能100%抑制尖孢镰刀菌的菌丝生长,且都从第3天起有少量菌丝生长;在第7天试验终点时,0.125%、0.250%和0.500%茶树油对尖孢镰刀菌的抑制率分别为34.0%、56.0%和71.0%。

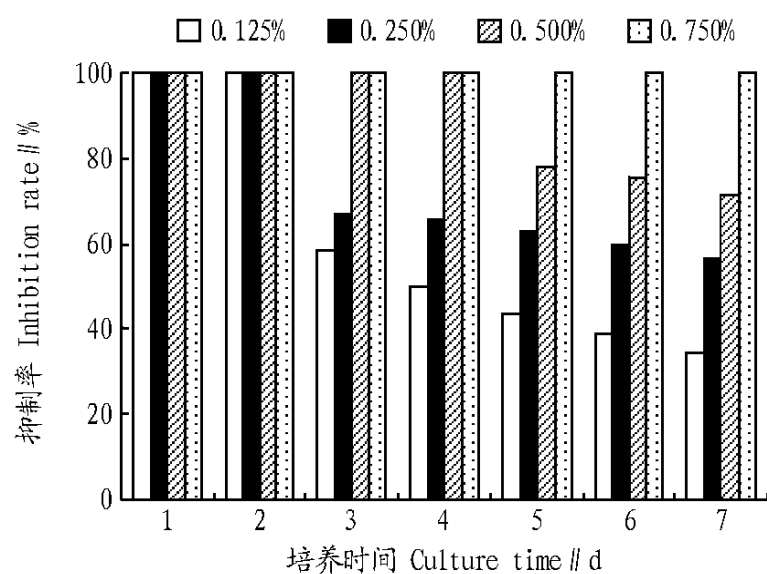


图2 不同浓度茶树油对尖孢镰刀菌菌丝生长的抑制率

Fig.2 The inhibition rate of tea tree oil at different concentrations on the mycelial growth of *Fusarium oxysporum*

2.3 不同浓度茶树油对水稻纹枯菌菌丝生长的影响 在测试的3种植物真菌中,茶树油对水稻纹枯菌的最小抑菌浓度最低。由图3可见,在连续5 d的试验观察中,0.125%茶树油均能100%抑制水稻纹枯菌的菌丝生长;0.050%茶树油在试验最初的4 d内能100%抑制水稻纹枯菌的菌丝生长,第5天开始有少量菌丝生长;0.025%茶树油的平板在试验最初的3 d内能100%抑制水稻纹枯菌的菌丝生长,从第4天起有少量菌丝生长;在第5天试验终点时,阳性对照组菌丝已经长满整个平皿,0.025%和0.050%茶树油对水稻纹枯菌的抑制率分别为64.0%和80.0%。

3 小结与讨论

对于该研究中测试的3种植物真菌水稻恶苗菌、尖孢镰刀菌和水稻纹枯菌,茶树油的最小抑菌浓度(MC)范围为

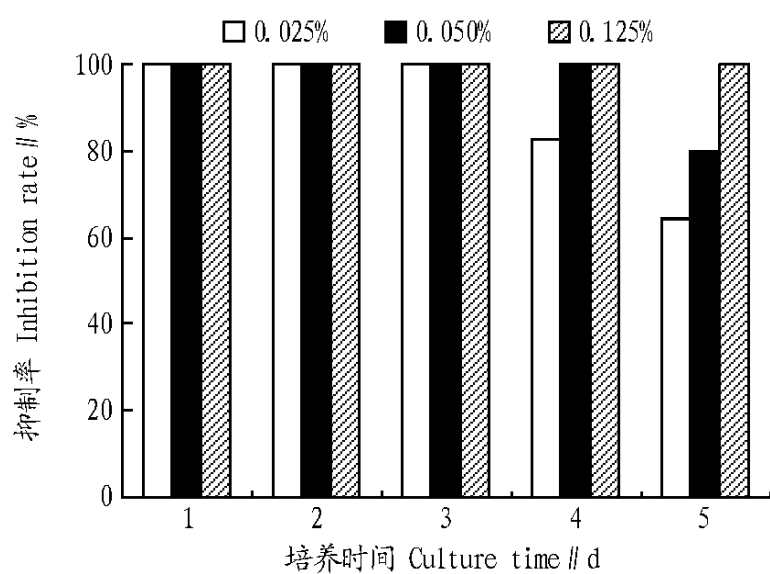


图3 不同浓度茶树油对水稻纹枯菌菌丝生长的抑制率

Fig.3 The inhibition rate of tea tree oil at different concentrations on the mycelial growth of *Rhizoctonia solani*

0.125%~1.000%。茶树油杀菌作用持久,对真菌的抑制作用因菌种而异。

茶树油由100多种组分组成,多种组分以多种机理发挥杀菌作用,具有作用靶点多、微生物不易产生耐药性^[9]等优点。茶树油中含有的脂溶性单萜,如萜品4醇、-萜品醇、芳樟醇、-蒎烯、1,8-桉叶素等是最有活性的抗菌成分^[8]。测试茶树油杀菌作用的困难在于纯茶树油不溶于水,漂浮在培养基的表面,茶树油和受试菌种不能形成良好的接触,影响茶树油杀菌效果的检测。茶树油能完全溶解于乙醇中,但是乙醇本身具有杀菌作用,因此会影响茶树油杀菌效果的判断。而表面活性剂Tween 80能使茶树油在水溶性介质中增溶而本身基本没有抗菌活性。

目前,用于杀菌的植物精油还相当有限,达不到商品化,主要原因是产品成本较高。由于茶树油杀菌具有高效性,抑制真菌的有效浓度低,故使用茶树油作为杀菌剂可以降低生产成本。此外,还需要进一步进行田间试验,验证茶树油抗真菌功效。相信随着研究的不断深入,对茶树油杀菌活性组分、杀菌机理的逐渐阐明,以茶树油为主要成分开发的植物源杀菌剂将有非常广阔的发展前景。

参考文献

- [1] BROPHY J J, DAMES N W, SOUTHWELL I A, et al. Gas chromatographic quality control for oil of *Melaleuca terpinen-4-ol* type (Austrian tea tree) [J]. *J Agric Food Chem*, 1989, 37: 1330-1335.
- [2] COX S D, MANNING M, MARKHAM J L. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* [J]. *Journal of Microbiology*, 2001, 91: 492-497.
- [3] OLIVA B, HICCI RILLI E, CEDDIA T, et al. Antimicrobial activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil and its major components [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2003, 37: 185-187.
- [4] CARSON C F, COOKSON B D, FARRELLY H D, et al. Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* [J]. *J Antimicrob Chemother*, 1995, 35: 421-424.
- [5] CAELLI M J, PORTEOUS C F, CARSON R, et al. Tea tree oil as an alternative topical deodorisation agent for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *J Hosp Infect*, 2000, 46: 236-237.
- [6] HAMMER K A, CARSON C F, RILEY T V. In vitro activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against dermatophytes and other filamentous fungi [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2002, 50(2): 195-199.
- [7] BISHOP C D. Antiviral activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheed (tea tree) against tobacco mosaic virus [J]. *J Essent Oil Res*, 1995, 7: 641-644.
- [8] CARSON C F, HAMMER K A, RILEY T V. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2006, 19(1): 50-62.
- [9] 陶凤云, 张新妙, 俞军, 等. 茶树油抗菌作用机理研究进展 [J]. *中国抗生素杂志*, 2006, 31(5): 261-266.

中包含了湿地的某种生态环境价值属性,通过人们为此支付的价格来推断湿地价值的方法,该法主要应用在房地产领域。其优点是直观,便于计算;缺点是受房产所在地区整体经济状况影响大,只适用于房地产开发区的生态价值评价。

3.1.3 资产价值法。资产价值法是用环境质量的变化引起资产价值的变化来估计环境污染或改善环境质量所带来的损失或收益。

3.2 间接使用价值评价方法

3.2.1 碳税法 and 造林成本法。碳税法是根据光合作用方程式,以干物质生产量来换算湿地植物固定 CO_2 和释放 O_2 的量,再根据国际和我国对 CO_2 排放收费标准,将生态指标换算成经济指标,得出固定 CO_2 的经济价值。造林成本法是单位面积植物碳素的净生长量和造林成本以及湿地植物总面积3者的乘积。

3.2.2 替代费用法。替代费用法是通过分析需花费多少钱才能替代某一开发项目对生产资料造成的损失,然后把这些费用与防止环境损失发生的费用相比较,如果替代费用大于预防费用,那么环境破坏就可以避免。

3.2.3 机会成本法。机会成本法指在资源稀缺的条件下使用一种方案则意味着必须放弃其他方案,而在被弃方案中可能获得的最大利益就构成了该方案的机会成本。在资源短缺时可用机会成本替代由此而引起的经济损失,但如何选择最大经济利益作为机会成本,仍需要依靠其他方法进行估算。

3.2.4 影子工程法。影子工程法指假设当环境破坏后,以人工建造一个新工程来替代原来生态系统的功能或原来被破坏的生态功能的费用,然后用建造新工程所需的费用来估算环境破坏(或污染)造成的损失的一种方法。如水分调节功能价值等于总水分调节量和单位蓄水量的库容成本之积。其优点是:直观,通过替代工程造价直接反映价值;缺点是:提供服务的当量效果值较难确定,各地生活、生产力水平发展不均,不能反映真实花费。

3.2.5 费用支出法。费用支出法指从消费者角度来核算生态环境效益的方法。它以人们对其中环境效益的支出费用来表示该效益的经济价值。如对自然景观的旅游价值,可用游客支出的费用总和作为该生态系统的旅游价值。费用支出法有3种形式:总支出法,以游客的费用总支出作为旅游价值;区内支出法,以游客在自然景观区支出的费用作为旅游价值;部分费用法,仅以游客支出的部分费用作为旅游价值。

3.2.6 生态价值法。生态价值法指将 R·Pearl 生长曲线与社会发展水平以及人们生活水平相结合。根据人们对某种生态功能的实际支付来估算该生态服务价值的方法。其反映了生态价值认识与经济水平的关系,有现成数据,但所得出

的结果过于宏观,不易比较不同湿地状况的细微差别。

3.3 非使用价值评价方法 非使用价值评价方法只有一种:条件价值法。

条件价值法也称为意愿调查法,它是一种直接调查方法,直接询问人们对某种生态系统服务的支付意愿(Willingness to pay, WIP)或对某种生态系统服务损失的接受赔偿意愿(Willingness to accept, WTA),以此来估计其价值。

条件价值法可表述如下:个人对各种市场商品和环境舒适性具有消费偏好,其对市场商品的消费用 X 表示(可以自由选择),环境物品用 Q 表示(不受个人支配),个人的效用函数可以表示为 $U(X, Q)$ 。个人对市场商品的消费受其可支配收入 Y 和商品价格 P 的限制。在一定的收入限制下,个人力图达到效用最大化的消费:

$$\max U(X, Q) \quad (3)$$

$$s.t \quad p_i x_i = y_0$$

受限的最优化产生1组常规需求函数: $X_i = h_i(p, q, y)$ ($i = 1, 2, \dots, n$, 为市场商品的种类)。定义间接效应函数为: $v(p, q, y) = u[h(p, q, y), q]$ 。在这里,效用为市场商品的价格和收入的函数,在这种情况下也是环境物品的函数。假定 p, y 不变,某种环境物品或服务 q 从 q_0 到 q_1 , 个人的效用相应地从 $u_0 = v(p, q_0, y)$ 变到 $u_1 = v(p, q_1, y)$ 。

假设变化是一种改进,即 $q_1 > q_0$, 则 $u_1 = v(p, q_1, y) > u_0 = v(p, q_0, y)$ 。这种效用变化可以用间接效用函数来测量: $v(p, q_1, y - C) = u(p, q_0, y)$ 。式中的补偿变化 C , 即是当 q 从 q_0 变化到 q_1 , 而效用在变化后与变化前保持不变时,所推导的个人支付意愿,即条件价值法调查试图引导的回答者个人的 WIP。由于环境物品的公共物品特性,总的 WIP 可以由个人的 WIP 加总获得。

4 结语

湿地是自然界最富生物多样性、生态功能全面、生产力最高的生态系统。它具有科研价值、教育价值、美学价值等多种功能,是重要的自然资源。因此,对湿地生态系统的价值进行评价有利于湿地的合理开发与利用。目前,关于湿地生态系统价值评价方法很多,在使用时还要结合实际情况进行分析,选用合适的方法。

参考文献

- [1] 傅娇艳,丁振华.湿地生态系统服务、功能和价值评价研究进展[J].应用生态学报,2007,18(3):681-686.
- [2] 庄大昌.洞庭湖湿地生态系统服务功能价值评估[J].经济地理,2004,24(3):391-394.
- [3] 张运,尹少华,储蓉.湿地生态系统经济价值评价的探讨[J].湖南林业科技,2007,34(3):17-20.
- [4] 杨志焕.亚热带人工湿地植物多样性与人工湿地价值评估[D].杭州:浙江大学,2006.
- [5] 江春波,惠二青,孔庆蓉.天然湿地生态系统评价技术研究进展[J].生态环境,2007,16(4):1304-1309.
- [6] 张晓惠.黄河三角洲湿地生态服务功能价值评估[D].济南:山东师范大学,2007.
- [12] 杜光,郑恒,宗凯.茶树油化学成分及抗菌作用研究[J].中国医院药学杂志,2004,24(8):462-463.
- [13] YIN L G, IIN N, WEI Q, et al. Antifungal activity of extracts from *Cerodendrum bungi* leaves against two species of phytopathogens[J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(1):143-145.
- [14] 张丹媚,李群,马丹炜,等.广西莪术油抑制植物病原真菌活性的研究[J].安徽大学学报:自然科学版,2008,32(1):81-84.

(上接第15056页)

[10] 李娟,李小瑞.茶树油的性质及其应用[J].日用化学工业,2008,33(5):323-325.

[11] Q L Y, IUL L, YUP R, et al. Preliminary studies on antifungal activity of *Xanthium sibiricum* and the endophytic fungi[J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(4):144-148.