

中草药提取物对果蔬病原真菌的抑制作用

李海燕, 关丽杰, 邵 双, 马金姗

(沈阳化工学院 环境与生物工程学院, 辽宁 沈阳 110142)

摘 要: 采用菌丝生长速率法测定了 19 种中草药乙醇提取物对 5 种果蔬病原真菌的抑制活性。结果表明: 在提取物浓度为 0.1 mg/mL 时, 稀荇草对草莓软腐病菌、葛根和鸦胆子对苹果褐腐病菌有抑制作用, 抑制率均在 20% 左右。射干对苹果轮纹病菌和苹果褐腐病菌的抑制率分别为 21.47% 和 21.9%, EC_{50} (有效中浓度) 值分别为 0.7928、0.9107 mg/mL。马兜铃对番茄灰霉病菌和苹果褐腐病菌的抑制率分别为 28.39% 和 49.64%, EC_{50} 值仅为 0.3732 和 0.1256 mg/mL。综合分析认为, 马兜铃值得进一步研究开发。

关键词: 中草药提取物; 果蔬病原菌; 抑制活性

中图分类号: S 432.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001—0009(2009)09—0030—03

从植物中寻找杀菌抑菌活性物质是开发无公害新型杀菌剂的一条有效途径^[1]。我国的中草药资源十分丰富, 药用植物种类约为 11 020 种, 这为植物源杀菌剂的研究提供了理想来源, 但目前只有少部分作了抑菌、抗菌活性研究^[2], 其研究成果也主要集中在农药上。近年来, 一些研究发现中草药提取物的杀菌成分对果蔬防腐保鲜也具有良好的效果。如丁香和黄芩提取物对芒果炭疽病菌具有很好的抑制作用^[3], 虎杖提取物对苹果褐腐病菌表现出强烈的抑制作用^[4], 相思树、雾冰藜、圣罗勒提取物对番茄晚疫病菌有防治作用^[5], 广藿香对辣椒炭疽病菌有很强的抑制作用^[6]。可见, 中草药果蔬防腐保鲜剂有着广阔的开发前景。该研究初步测试了稀荇草、马齿苋等 19 种中草药的乙醇提取物对 5 种常见果蔬病原真菌的抑制活性, 为进一步开发中草药源果蔬保鲜剂提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试中草药 19 种中草药名称见表 1, 均购自辽宁省沈阳市中草药店, 60℃烘干, 粉碎后过 0.425 mm 孔径筛, 置于密封袋中, 低温保存备用。

1.1.2 供试菌种 苹果轮纹病菌 (*Physalospora piricola*)、草莓软腐病菌 (*Rhizopus stolonifer*)、芒果炭疽病菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*)、苹果褐腐病菌 (*Monilinia fructigena*) 和番茄灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*) 5 种病

原真菌由沈阳化工学院农药研究室提供。

表 1 中草药名称及供试部位

Table 1 Chinese herb names and tested parts

药用植物	学名	科	供试部位
Medicinal plants	Latin name	Family	Tested parts
柴胡	<i>Bupleurum chinense</i> DC.	伞形科	根
鬼针草	<i>Bidens pilosa</i> Linn.	菊科	全草
黄精	<i>Polygonatum sibiricum</i> Red.	百合科	根茎
马齿苋	<i>Portulaca oleracea</i> Linn.	马齿苋科	茎叶
葛根	<i>Pueraria lobata</i> (Willd.) Ohwi	豆科	根
黄芪	<i>Astragalus membranaceus</i> (Fisch.) Bunge	豆科	根
黄药子	<i>Dioscorea bulbifera</i> Linn.	薯蓣科	块茎
紫苏	<i>Perilla frutescens</i> (Linn.) Britt.	唇形科	茎叶
青箱子	<i>Celosia argentea</i> Linn.	苋科	种子
石榴皮	<i>Punica granatum</i> Linn.	石榴科	果皮
射干	<i>Belamcanda chinensis</i> (Linn.) Redoué	鸢尾科	根茎
山慈姑	<i>Cremastra appendiculata</i> (D. Don) Makino	兰科	假鳞茎
鸦胆子	<i>Brucea javanica</i> (Linn.) Merr.	苦木科	果实
罗布麻	<i>Apocynum venetum</i> Linn.	夹竹桃科	全草
半边莲	<i>Lobelia chinensis</i> Lour.	桔梗科	全草
稀荇草	<i>Siegesbeckia puleascens</i> Makino.	菊科	茎叶
白果	<i>Ginkgo biloba</i> Linn.	银杏科	种子
天花粉	<i>Trichosanthes kirilowii</i> Maxim.	葫芦科	根
马兜铃	<i>Aristolochia debilis</i> Sieb. et Zucc.	马兜铃科	果实

1.2 方法

1.2.1 中草药提取物的制备 称取一定质量的中草药干粉, 加入 10 倍体积 (V : W) 的 70% 乙醇溶液, 于 25℃ 下浸提 4 h, 抽滤, 滤渣再用 70% 乙醇重复提取 2 次, 合并滤液, 经 50℃ 减压浓缩、真空干燥至恒重, 称重并计算提取率 (表 2), 再密封, 置于 4℃ 冰箱中保存备用。

1.2.2 中草药抑菌活性测定 采用生长速率法^[7] 测定中草药提取物对病原菌菌丝生长的抑制作用。用 70% 乙醇将上述中草药提取物充分溶解, 制成 10 mg/mL 的母液。将母液加至 PDA 培养基中, 制成终浓度为 0.1 mg/mL 的含药培养基, 倒皿, 待冷却后在平板中央分别

第一作者简介: 李海燕 (1975), 女, 辽宁沈阳人, 硕士, 讲师, 现主要从事无公害果蔬保鲜剂的研究工作。E-mail: lihaiyan98@163.com.
基金项目: 辽宁省教育厅高等学校科学研究资助项目 (2004D205)。
收稿日期: 2009—04—20

移入一块培养好的直径为 4 mm 的供试菌饼。每个处理重复 3 次,以加相应量乙醇的 PDA 培养基作为对照。置于 26℃恒温培养,待对照组菌落接近长满平板时,用十字交叉法测量菌落直径并计算抑菌率,公式如下:

抑制率(%)= $\frac{\text{对照菌落直径}-\text{处理菌落直径}}{\text{对照菌落直径}-\text{菌饼直径}}\times 100\%$ 。

表 2 中草药的提取率

Table 2 Extraction rate of Chinese herbs			
中草药	提取率	中草药	提取率
Chinese herbs	Extraction rate/ %	Chinese herbs	Extraction rate/ %
柴胡	2	射干	9
鬼针草	4	山慈菇	2.5
黄精	6.5	鸦胆子	10
马齿苋	5.5	马兜铃	7
葛根	5	罗布麻	9
黄芪	15.5	半边莲	7.5
黄药子	7.5	豨莶草	4.5
紫苏	2	白果	3
青箱子	7	天花粉	0.5
石榴皮	16.5		

表 3 19 种中草药提取物对 5 种病原菌菌丝生长的抑制作用

Table 3 Inhibition of 19 Chinese herb extracts on mycelial growth of 5 pathogenic fungi					
中草药	抑制率 Inhibition rate/ %				
	草莓软腐病菌	苹果轮纹病菌	芒果炭疽病菌	番茄灰霉病菌	苹果褐腐病菌
Chinese herbs	<i>Rhizopus stolonifer</i>	<i>Physalospora piricola</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Monilinia fructigena</i>
柴胡	10.19bc	5.46d	15.59ab	19.57b	19.69cd
黄精	—	—	4.05e	8.78de	11.71efg
葛根	—	—	3.86e	9.46de	20.07bcd
黄芪	—	—	9.84bc	—	—
黄药子	1.65d	14.05b	8.91bcd	—	5.81hi
紫苏	16.85ab	—	14.10ab	4.39ef	16.77cde
白果	—	—	15.25ab	—	1.45i
天花粉	—	—	10.05bc	2.36f	5.47hi
射干	—	21.47a	6.73cde	6.07ef	21.9bc
山慈菇	—	—	3.25e	2.69f	15.36de
鸦胆子	1.32d	—	16.38a	4.71ef	25.54b
马兜铃	3.05cd	11.70bc	7.20cd	28.39a	49.64a
马齿苋	11.43bc	—	—	1.65f	—
豨莶草	20.06a	—	5.04e	13.48cd	12.61df
石榴皮	9.85bc	11.30bc	—	—	—
鬼针草	11.40bc	—	7.99cd	16.42bc	9.12fgh
青箱子	13.32ab	8.59cd	1.96e	—	—
罗布麻	9.24bcd	5.10d	6.25de	—	6.45ghi
半边莲	10.18bc	—	—	13.91cd	—

注 ①表中所有中草药提取物的浓度为 0.1 mg/mL; ②“—”表示对菌丝生长无抑制作用; ③数据为 3 次重复的平均值, 同列数据后标不同字母者表示在 5%水平上差异显著(Duncan 法)。

由表 3 可见,在中草药提取物浓度为 0.1 mg/mL 的条件下,19 种中草药中,马兜铃提取物的抑菌效果最好,对 5 种供试菌中的 2 种均表现出显著的抑制活性,其中对番茄灰霉病菌菌丝生长的抑制率为 28.39%,对苹果褐腐病菌菌丝生长的抑制率高达 49.64%。射干提取物也对 2 种病原真菌表现出抑制作用,但抑制效果次之,对苹果轮纹病菌和苹果褐腐病菌菌丝生长的抑制率分别为 21.47%和 21.9%。豨莶草对草莓软腐病菌、葛根和鸦胆

1.2.3 毒力回归方程的建立 选定对 2 种病原真菌有较好抑制效果的中草药,用 70%乙醇将其溶解配成一定浓度的母液,再等比稀释成 128、64、32、16、8、4 mg/mL 系列浓度,分别加入到 PDA 培养基中,制成终浓度为 1.28、0.64、0.32、0.16、0.08、0.04 mg/mL 的含药培养基。按 1.2.2 中的方法测定各浓度下的菌落直径,计算抑菌率。以浓度的对数值(x),抑菌率的机率值(y)求回归方程,计算相关系数和 EC₅₀。

1.2.4 试验数据统计分析 试验结果采用 Microsoft Excel 软件进行数据处理,经 DPS(Data Processing System)统计软件进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 中草药提取物对 5 种病原菌菌丝生长的抑制作用 采用生长速率法测定了 19 种中草药乙醇提取物对 5 种病原真菌的抑制活性。结果表明,不同植物样品对同一病原菌的抑制活性以及同一植物样品对不同病原菌的抑制活性均存在一定的差异,详见表 3。

子对苹果褐也有抑制作用,抑制率均在 20%左右。其余中草药提取物对供试菌的抑制效果均较差,有的甚至表现出轻微的促进作用。另外,由表 3 还可以看出,在供试浓度下,所有中草药提取物对芒果炭疽病菌的菌丝生长均未表现出明显的抑制作用,抑制率均低于 20%。

2.2 马兜铃和射干提取物对病原真菌的毒力

在 19 种中草药提取物中,马兜铃和射干均对 5 种供试菌中的 2 种表现出抑制活性,为进一步研究它们对病

原菌的抑制效果, 分别测定了其毒力, 结果见表 4、5。

表 4 马兜铃乙醇提取物对 2 种病原真菌的毒力

Table 4 The vinulence of ethanol extract of <i>Aristolodia debilis</i> against mycelial growth of 2 pathogenic fungi			
病原真菌	毒力回归方程	相关系数 <i>r</i>	<i>EC</i> ₅₀
Pathogenic fungi	Regressive equation	Correlation coefficient	/ mg * mL ⁻¹
番茄灰霉病菌	<i>y</i> = 5. 5033+1. 1756 <i>x</i>	0. 9835	0. 3732
苹果褐腐病菌	<i>y</i> = 5. 8382+0. 9302 <i>x</i>	0. 9850	0. 1256

表 5 射干乙醇提取物对 2 种病原真菌的毒力

Table 5 The vinulence of ethanol extract of <i>Belamcanda chinensis</i> against mycelial growth of 2 pathogenic fungi			
病原真菌	毒力回归方程	相关系数 <i>r</i>	<i>EC</i> ₅₀
Pathogenic fungi	Regressive equation	Correlation coefficient	/ mg * mL ⁻¹
苹果轮纹病菌	<i>y</i> = 5. 0994+0. 9857 <i>x</i>	0. 9766	0. 7928
苹果褐腐病菌	<i>y</i> = 5. 0406+0. 9985 <i>x</i>	0. 9722	0. 9107

2 种提取物在 0~1. 28 mg/mL 范围内, 随着药剂浓度的提高, 其抑菌作用逐渐增强, 菌落扩散速度减慢。其中马兜铃提取物对番茄灰霉病菌 *EC*₅₀ 为 0. 3732 mg/mL, 对苹果褐腐病菌的 *EC*₅₀ 为 0. 1256 mg/mL。射干提取物对苹果轮纹病菌的 *EC*₅₀ 为 0. 7928 mg/mL, 对苹果褐腐病菌的 *EC*₅₀ 为 0. 9107 mg/mL。

3 结论与讨论

植物是生物活性化合物的巨大天然宝库, 目前国内外对植物源抑菌物质的研究非常活跃^[8-10]。该试验采用菌丝生长速率法, 对中草药乙醇提取物进行了抑菌活性测定。结果表明, 在提取物浓度为 0. 1 mg/mL 的条件下, 豨莶草、葛根、鸦胆子、马兜铃和射干提取物对至少 1 种供试病原菌有较好的抑制作用, 其中马兜铃和射干对 2 种供试病原菌有抑制活性。毒力测试结果显示, 随着马兜铃和射干提取物浓度的升高, 抑菌活性也逐渐增强, 且马兜铃对番茄灰霉病菌和苹果褐腐病菌的 *EC*₅₀ 值仅为 0. 3732 和 0. 1256 mg/mL, 可以推断马兜铃体内的有效成

分具有强烈的抑菌活性, 分离这些活性物质并鉴定其分子结构, 有可能发现具有新型杀菌活性的先导化合物, 因此, 马兜铃具有开发的潜力, 值得进一步研究。

为了筛选出强抑菌活性物质, 该试验使用的中草药提取物浓度较低, 仅为 0. 1 mg/mL, 因此有些生物活性物质可能因为含量少而被漏筛。另外, 该研究获得的仅是在室内离体条件下提取液和病原菌相互作用的结果, 筛选出的强抑菌活性物质, 还需进一步通过活体试验来检测其防治效果。

参考文献

[1] 张国珍, 樊瑛, 丁万隆, 等. 麻黄和细辛挥发油的抗真菌作用[J]. 植物保护学报, 1995, 22(4): 373-374.
[2] 严振, 莫小路, 王玉生. 中草药源农药的研究与应用[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(21): 1714-1717.
[3] 施瑞城, 李婷, 侯晓东, 等. 23 种中草药提取物对芒果炭疽病菌的抑制作用研究[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(9): 123-126.
[4] 朱立成, 刘文, 王祥胜, 等. 丁香等 3 种中草药提取物抑制植物病原真菌的研究[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(21): 5581-5582.
[5] Babu S, Seetharanman K, Nandakumar R, et al. Effect of selected plant extracts/ oils against tomato leaf blight disease [J]. International Journal of Tropical Agriculture, 2000, 18(2): 133-137.
[6] 莫小路, 严振, 王玉生, 等. 广藿香精油对植物病原真菌的抑菌活性研究[J]. 中药材, 2004, 27(11): 805-807.
[7] 吴文君. 植物化学保护实验技术导论[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1988.
[8] 张应路, 尹彩萍, 冯俊涛, 等. 植物源杀菌剂的研究进展[J]. 西南民族大学学报(自然科学版), 2005, 31(3): 402-409.
[9] Jayasinghe L, Balasooriya B A, Padmini W G, et al. Geranyl chalcone derivatives with antifungal and radical scavenging properties from the leaves of *Artocarpus nobilis* [J]. Phytochemistry, 2004, 65(9): 1287-1290.
[10] Malquichagua-Salazar K J, Delgado-Paredes G E, Llunor L R, et al. Chromenes of polyketide origin from *Peperomia villipetola* [J]. Phytochemistry, 2005, 66(5): 573-579.

Inhibition of Chinese Herb Extracts on Fruit-vegetable Pathogenic Fungi

LI Hai-yan, GUAN Li-jie, SHAO Shuang, MA Jin-shan

(College of Environmental and Biological Engineering, Shenyang Institute of Chemical Technology, Shenyang, Liaoning 110142, China)

Abstract: Ethanol extracts from 19 Chinese herbs were obtained. Then their inhibitory activities against 5 fruit-vegetable pathogenic fungi were assayed *in vitro* using growth rate method with concentration of 0. 1 mg/mL. The results showed that the inhibitory rates of *Siegesbeckia pubescens* against *Rhizopus stolonifer*, *Pueraria lobata* and *Brucea javanica* against *Monilinia fructigena* were about 20%. Whereas those of *Belamcanda chinensis* against *Physalospora piricola* and *Monilinia fructigena* were 21.47% and 21.9% respectively, their *EC*₅₀ were 0.7928 and 0.9107 mg/mL. *Aristolochia debilis* hampered the growth of *Botrytis cinerea* and *Monilinia fructigena* with 28.39% and 49.64% inhibitory rates respectively, their *EC*₅₀ were 0.3732 and 0.1256 mg/mL. According to the above results, *Aristolochia debilis* was chosen as plant fungicide for more study.

Key words: Chinese herb extract; Pathogenic fungus; Inhibitory activity