

辛夷六种溶剂平行提取物对黄瓜灰霉病菌的抑制作用

李凡海, 王桂清

(聊城大学 农学院, 山东 聊城 252059)

摘 要:采用平行提取法,研究石油醚、氯仿、乙酸乙酯、丙酮、乙醇、水6种溶剂对辛夷提取率的影响,采用生长速率法和孢子萌发法分别测定了辛夷6种平行提取物对黄瓜灰霉病致病菌——灰葡萄孢菌的菌丝生长和孢子萌发的抑制效果。结果表明:去离子水的提取率最大为25.71%,石油醚最小为9.63%;辛夷6种平行提取物对灰葡萄孢菌的菌丝生长和孢子萌发均有抑制作用;石油醚、氯仿提取物对菌丝生长的 EC_{50} 分别为372.15、206.83 mg/L,对孢子萌发的 EC_{50} 分别为1 318.92、591.78 mg/L,抑菌效果较好;水提取物对菌丝生长和孢子萌发的 EC_{50} 分别为6 024.25、3 532.13 mg/L。说明辛夷有机溶剂提取物对菌丝生长的抑制效果优于其对孢子萌发的抑制效果,且辛夷的主要抑菌活性成分较易被极性小的有机溶剂提取。

关键词:辛夷;平行提取物;灰葡萄孢菌;抑制作用

中图分类号:S 436.421.1⁺1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)02-0108-04

大量使用化学农药防治植物病害虽取得了可喜的效果,但是也出现了环境污染、农药残留、病原菌产生抗性问题^[1]。植物源农药来源于自然环境,具有易降解、低毒性、对环境污染小等特点,符合当今社会的发展趋势,已成为研究的热点^[2]。辛夷是我国一种传统中药,是望春玉兰花瓣的统称^[3]。辛夷提取物具有抑菌活性,其起抑菌作用的主要活性成分存在于其挥发油中^[4-6]。该试验以辛夷的6种溶剂平行提取物为试材,研究其对黄瓜灰霉病致病菌——灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea* Pers.)的菌丝生长和孢子萌发的抑制作用,以期对辛夷作为植物源农药的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试试剂为石油醚、氯仿、乙酸乙酯、丙酮、乙醇、水。供试材料为望春玉兰花瓣(辛夷)。供试菌株为灰葡萄孢菌由感染灰霉病的黄瓜上分离、纯化获得,保存

于聊城大学农学院植物病理学实验室。

1.2 试验方法

1.2.1 辛夷提取物的制备 采用索氏提取法^[7-8],选取极性不同的溶剂(极性:石油醚<氯仿<乙酸乙酯<丙酮<乙醇<水)分别对望春玉兰花瓣(辛夷)进行平行提取。将提取液旋转蒸发浓缩得到黏稠膏状粗提物,称重并计算其提取率,置于4℃冰箱保存。无菌条件下,用微量二甲亚砜(不超过总体积2%)分别将辛夷6种不同溶剂的提取物充分溶解,然后用无菌水配制成40 000 mg/L的母液,采用二倍稀释法将母液配成40 000、20 000、10 000、5 000、2 500 mg/L等5个浓度梯度。提取率(%)=提取干物质重量(g)/样品总重量(g)×100%。

1.2.2 离体生物测定 生长速率法^[9]:测定辛夷的6种溶剂提取物对菌丝生长的抑制效果。培养基为含药PDA(葡萄糖-马铃薯-琼脂培养基),空白对照不加药;提取物终浓度分别为4 000、2 000、1 000、500、250 mg/L;菌饼直径为0.5 cm;十字交叉法测量菌落直径,3次重复。根据菌落直径求菌丝生长抑制率,公式如下:校正直径(cm)=平均直径(cm)-菌饼直径(cm),抑制率(%)=(对照校正直径-处理校正直径)/对照校正直径×100%。孢子萌发法^[10](悬滴法):分别测定辛夷的6种溶剂提取物对病原菌孢子萌发的抑制作用。提取物终浓度分别为4 000、2 000、1 000、500、250 mg/L,3次重复,根据下列公式计算抑制率。萌发率(%)=孢子萌发数/

第一作者简介:李凡海(1988-),男,山东聊城人,硕士研究生,研究方向为有害生物防治。E-mail:weixiaodexiawang@126.com.

责任作者:王桂清(1968-),女,河北泊头人,博士,教授,现主要从事植物保护的教学与科研工作。E-mail:wangguiqing@lzu.edu.cn.

基金项目:山东省自然科学基金资助项目(ZR2012CL17);聊城大学重点建设资助项目(13KZ0801)。

收稿日期:2014-09-04

检查孢子总数 $\times 100\%$, 孢子萌发抑制率($\%$)=(对照萌发率—处理萌发率)/对照萌发率 $\times 100\%$ 。根据辛夷提取物对灰葡萄孢菌孢子萌发的抑制效果, 将浓度转化为对数, 抑菌的百分率转化为几率值, 求出辛夷提取物对灰葡萄孢菌孢子萌发的抑制中浓度(EC_{50})。

1.3 数据分析

应用 Microsoft Excel 软件处理数据; 采用 SPSS 10.0 软件建立毒力回归曲线, 将抑菌的百分率转换成几率值, 浓度转换成对数, 进行几率值分析, 分别求出辛夷的 6 种溶剂提取物对灰葡萄孢菌的抑制中浓度(EC_{50})^[11]; 利用 DPS v3.01 专业版软件, 依据 Duncan's 新复极差法进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 6 种溶剂对辛夷的提取率

提取率的高低反映植物材料在溶剂中溶解量的多少。由表 1 可以看出, 平行提取时, 石油醚对辛夷的提取率为 9.63%, 氯仿的提取率为 15.58%, 乙醇的提取率

为 23.22%, 去离子水的提取率为 25.71%。各溶剂对辛夷的提取率随着溶剂极性的增大而升高, 说明辛夷中的物质容易被极性较大的溶剂提取。

2.2 辛夷 6 种平行提取物对黄瓜灰葡萄孢菌菌丝生长的抑制作用

以生长速率法测定了辛夷的 6 种平行提取物对灰葡萄孢菌菌丝生长的抑制作用, 根据辛夷提取物对灰葡萄孢菌菌丝生长的抑制效果, 将浓度转化为对数, 抑菌的百分率转化为几率值, 求出了辛夷提取物对灰葡萄孢菌菌丝生长的抑制中浓度(EC_{50})。

由表 2 可以看出, 6 种辛夷平行提取物对灰葡萄孢菌菌丝的生长有抑制作用, 但各溶剂提取物之间存在差距。当提取物浓度为 4 000 mg/L 时, 石油醚提取物的抑菌效果最好, 抑菌率达到 99.19%; 其它 4 种有机溶剂提取物相差不大, 抑菌率均在 84% 左右; 去离子水提取物的抑菌效果最差, 抑菌率仅为 52.30%。说明辛夷的抑菌活性成分易被有机溶剂提取。

表 1 辛夷各样品的提取率
Table 1 The extracted rate of violet magnolia

提取方法 Extraction method	提取溶剂 Plant material	样品重 Sample weight/g	提取物重 Extract weight/g	提取率 Extracted rate/%
平行提取 Parallel extraction	石油醚 Petroleum ether	30	2.89	9.63
	氯仿 Chloroform	30	4.67	15.58
	乙酸乙酯 Ethyl acetate	30	5.34	17.80
	丙酮 Acetone	30	5.02	17.72
	乙醇 Ethanol	30	6.97	23.22
	水 Water	30	7.71	25.71

表 2 辛夷平行提取物对灰葡萄孢菌菌丝生长的抑制率
Table 2 The inhibition rate of violet magnolia parallel extracts to the mycelium growth of *B. cinerea*

提取溶剂 Extraction solvent	菌丝生长抑制率 Inhibition rate/%				
	4 000 mg/L	2 000 mg/L	1 000 mg/L	500 mg/L	250 mg/L
石油醚 Petroleum ether	99.19 \pm 0.00aA	84.82 \pm 2.33aA	76.15 \pm 1.67aA	65.31 \pm 2.68aA	45.53 \pm 1.15bB
氯仿 Chloroform	85.91 \pm 0.77bB	75.61 \pm 1.15bB	71.27 \pm 1.38bB	61.52 \pm 2.51abAB	53.39 \pm 3.27aA
乙酸乙酯 Ethyl acetate	82.93 \pm 2.66bB	75.75 \pm 0.69bB	67.21 \pm 1.67cB	45.80 \pm 1.67dD	42.28 \pm 1.15bcBC
丙酮 Acetone	82.79 \pm 1.57bB	68.02 \pm 4.20cC	69.65 \pm 1.92bcB	53.12 \pm 3.27cC	32.52 \pm 0.66dD
乙醇 Ethanol	86.72 \pm 2.76bB	75.33 \pm 1.01bB	69.65 \pm 1.67bcB	57.45 \pm 1.53bcBC	38.75 \pm 1.67cC
水 Water	52.30 \pm 0.77cC	29.27 \pm 1.15dD	14.91 \pm 1.01dC	14.36 \pm 0.38eE	13.28 \pm 1.04eE

注: 差异显著性是根据新复极差测验统计出来的, 标注了在 $P_{0.05}$ 及 $P_{0.01}$ 2 个水平上的差异性。下同。
Note: Numbers followed by different letters are not significant according the Duncan multiple range test at $P_{0.05}$, $P_{0.01}$.

由表 3 可以看出, 6 种辛夷平行提取物对菌丝生长的抑菌结果构建的毒力回归方程的相关系数均大于 0.9, 相关性较高, 数据具有可信度。 EC_{50} 最小的为氯仿提取物, 为 206.83 mg/L, 其次为石油醚提取物, 为

372.15 mg/L; 水的 EC_{50} 最大, 为 6 024.25 mg/L。总体来看, 极性较小的溶剂的提取物对菌丝生长的抑制效果较明显。

表 3 辛夷平行提取物对灰葡萄孢菌菌丝生长的抑制作用

Table 3 The effect of violet magnolia parallel extracts to the mycelium growth of *B. cinerea*

提取溶剂	毒力回归方程	相关系数(R)	EC ₅₀	置信区间
Extraction solvent	Regression equation	Correlation coefficient	/(mg·L ⁻¹)	Confidence interval
石油醚 Petroleum ether	y=0.3581+1.8459x	0.9413	372.15	252.43~423.90
氯仿 Chloroform	y=3.1667+0.7917x	0.9899	206.83	107.20~399.05
乙酸乙酯 Ethyl acetate	y=2.2737+1.0284x	0.9811	447.67	318.97~628.30
丙酮 Acetone	y=2.1332+1.0592x	0.9581	508.92	373.55~693.33
乙醇 Ethanol	y=2.1590+1.0946x	0.9895	393.86	278.45~557.10
水 Water	y=1.4079+0.9503x	0.9006	6024.25	3233.73~11222.79

2.3 辛夷 6 种平行提取物对灰葡萄孢菌孢子萌发的抑制作用

由表 4 可以看出,辛夷的平行提取物对灰葡萄孢菌的孢子萌发起抑制作用。当浓度为 4 000 mg/L 时,石油醚提取物的抑菌效果最好,抑菌率为 79.50%;其次为氯

仿提取物,抑菌率为 76.21%;水提取物的抑菌效果最差,抑菌率仅为 46.71%。总体来看,辛夷中起抑菌作用的活性物质易被有机溶剂提取,溶剂极性越小,提取物的抑菌活性越强。

表 4 辛夷平行提取物对灰葡萄孢菌孢子萌发的抑制率

Table 4 The inhibition rate of violet magnolia parallel extracts to the spore germination of *B. cinerea*

提取溶剂	孢子萌发抑制率 Inhibition rate/%				
Extraction solvent	4 000 mg/L	2 000 mg/L	1 000 mg/L	500 mg/L	250 mg/L
石油醚 Petroleum ether	79.50±0.96aA	57.67±1.28bB	34.59±1.93bcBC	29.34±0.38bB	17.84±0.96bB
氯仿 Chloroform	76.21±0.29bB	70.74±0.73aA	68.08±0.69aA	48.28±2.14aA	29.97±1.60aA
乙酸乙酯 Ethyl acetate	56.49±1.06dD	41.71±2.93dD	17.45±3.31dD	6.96±1.23dD	3.91±1.06cC
丙酮 Acetone	58.06±0.55dD	50.16±0.29cC	31.85±1.30cC	25.04±1.41cBC	15.10±2.38bB
乙醇 Ethanol	60.95±0.44cC	41.31±1.07dD	13.30±1.44eD	9.62±1.17dD	3.05±0.19cC
水 Water	46.71±1.20eE	42.88±0.96dD	37.87±1.11bB	23.40±1.55cC	12.36±0.55cC

由表 5 可以看出,6 种辛夷平行提取物对孢子萌发的抑菌结果构建的毒力回归方程的相关系数均大于 0.9,相关性较高,数据具有可信度。在 6 种平行提取物中,EC₅₀最小的为氯仿提取物,仅为 591.78 mg/L,其次为石油醚提取物,为 1 318.92 mg/L;EC₅₀最大的为水提

取物,为 3 532.13 mg/L。总体来说,6 种溶剂提取物中,有机溶剂提取物对孢子萌发的抑菌效果比去离子水提取物的抑菌效果好,其中氯仿提取物达到半致死量时的浓度最低,说明辛夷的抑菌活性成分更易被氯仿提取。

表 5 辛夷平行提取物对灰葡萄孢菌孢子萌发抑制作用

Table 5 The effect of violet magnolia parallel extracts to the spore germination of *B. cinerea*

提取溶剂	毒力回归方程	相关系数(R)	EC ₅₀	置信区间
Extraction solvent	Regression equation	Correlation coefficient	/(mg·L ⁻¹)	Confidence interval
石油醚 Petroleum ether	y=0.6182+1.4043x	0.9762	1318.92	1078.00~1613.67
氯仿 Chloroform	y=2.1767+1.0184x	0.9526	591.78	440.04~795.86
乙酸乙酯 Ethyl acetate	y=-0.9448+1.7002x	0.9905	3137.97	2372.95~4149.62
丙酮 Acetone	y=1.4686+1.0458x	0.9923	2380.91	1683.44~3367.37
乙醇 Ethanol	y=-1.2142+1.7894x	0.9849	2970.27	2287.71~3856.47
水 Water	y=1.8230+0.8954x	0.9555	3532.13	2138.20~5834.79

3 结论与讨论

该试验采用平行提取法,用 6 种溶剂(石油醚、氯仿、乙酸乙酯、丙酮、乙醇、水)对辛夷进行提取,发现石油醚对辛夷的提取率为 9.63%,氯仿的提取率为 15.58%,乙醇的提取率为 23.22%,去离子水的提取率为 25.71%。说明各溶剂对辛夷的提取率随着溶剂极性的增大而升高,辛夷中的物质容易被极性较大的溶剂提

取;采用生长速率法测定各样品对菌丝生长的作用,孢子萌发法测定各样品对孢子萌发的作用。结果表明,辛夷 6 种溶剂的平行提取物对灰葡萄孢菌的菌丝生长和孢子萌发均有较好的抑制作用。其中,石油醚、氯仿提取物对菌丝生长的 EC₅₀ 分别为 372.15、206.83 mg/L,对孢子萌发的 EC₅₀ 分别为 1 318.92、591.78 mg/L,抑菌效果较好;水提取物对菌丝生长和孢子萌发的 EC₅₀ 分别为

6 024.25 mg/L和 3 532.13 mg/L。

综上所述,辛夷中的一些物质虽易被去离子水提取,但这些物质没有抑菌活性;辛夷的主要抑菌活性物质为脂溶性物质,易被有机溶剂提取,溶剂极性越小,辛夷提取液对孢子萌发的抑制效果越明显;用单一溶剂提取辛夷的有效成分时,可以选择石油醚或氯仿,以及二者极性相当或极性处于二者之间的溶剂;6种测试溶剂提取物对菌丝生长的抑制效果优于对孢子萌发的抑制效果。

目前,国内利用植物粗提取物对病原菌抑制作用的研究较多。如王桂清^[12]研究发现辽细辛根的不同溶剂粗提取物对灰葡萄孢菌菌丝生长和孢子萌发的抑制作用,发现其对灰葡萄孢菌菌丝生长和孢子萌发均有抑制作用,且对孢子萌发的抑制效果优于对菌丝生长的抑制效果;胡秀荣等^[13]研究柑桔提取物对黄瓜灰霉病菌的抑制作用,发现其对黄瓜灰霉病菌有明显的抑制作用;王帅等^[14]研究药用植物提取物对草莓灰霉病菌的抑菌活性,发现五味子对菌丝生长的抑制率最高,其次为薏苡、决明和酸浆;李红梅等^[5]研究发现辛夷提取物对板蓝根根腐病菌(*Fusarium solani*)菌丝生长及孢子萌发的抑制作用;王树桐等^[6]研究发现辛夷提取物对香蕉枯萎病原菌(*F. oxysporum*)菌株 B1 和 B2 的菌丝生长和孢子萌发有抑制效果。该研究表明辛夷提取物对灰葡萄孢菌有抑制效果,符合前人研究,丰富了其抑菌谱,同时也为辛夷提取物作为生物制剂提供了理论依据。

参考文献

- [1] 屠豫钦. 正确认识化学农药的问题[J]. 植物保护, 2003, 29(4): 11-15.
- [2] 王可. 我国生物农药研究现状及发展前景[J]. 广东化工, 2012, 39(6): 88-89.
- [3] 杨青山, 周建理. 中药辛夷的生药学研究概况[J]. 安徽中医学院学报, 2010, 29(5): 78-80.
- [4] 王永慧, 叶方, 张秀华. 辛夷药理作用和临床应用研究进展[J]. 中国医药导报, 2012, 9(16): 12-14.
- [5] 李红梅, 曹静, 张凤巧. 中草药提取物对板蓝根根腐病菌抑制作用研究[J]. 河南农业科学, 2009(6): 100-104.
- [6] 王树桐, 黄惠琴, 方哲. 中草药提取物对香蕉镰刀菌枯萎病原菌的抑制作用[J]. 热带作物学报, 2008, 29(1): 78-82.
- [7] 唐裕芳, 张妙玲, 陶能国, 等. 苍术挥发油的提取及其抑菌活性研究[J]. 西北植物学报, 2008, 28(3): 588-594.
- [8] 韦芳三, 李纯厚, 戴明, 等. 索氏提取法测定海洋微藻粗脂肪含量及其优化方法的研究[J]. 上海海洋大学学报, 2011, 20(4): 619-623.
- [9] 王桂清. 离体条件下细辛精油对 3 种棉花病害致病菌的抑菌活性[J]. 农业科技与装备, 2008, 178(4): 41-44.
- [10] 王桂清, 张军华, 张敏, 等. 辽细辛提取物对拟盘多毛孢菌的离体抑制作用[J]. 河南农业科学, 2008(2): 60-63.
- [11] 华南农业大学. 植物化学保护[M]. 2 版. 北京: 农业出版社, 1998: 518-520.
- [12] 王桂清. 辽细辛提取物对灰葡萄孢菌的抑制效果[J]. 植物保护, 2008, 34(2): 53-57.
- [13] 胡秀荣, 牡丹超, 黄振东, 等. 柑桔提取物对 8 种植物病原真菌的抑制作用研究[J]. 中国南方果树, 2011, 40(5): 1-4.
- [14] 王帅, 傅俊范, 严雪瑞. 药用植物提取物对草莓灰霉病菌抑菌活性研究[J]. 植物保护, 2006, 32(2): 59-60.

The Antibacterial Activity of Six Kinds Violet Magnolia Parallel Extracts on *Bocrytis cinerea* Pers.

LI Fan-hai, WANG Gui-qing

(College of Agriculture, Liaocheng University, Liaocheng, Shandong 252059)

Abstract: The effects on violet magnolia extraction ratio of petroleum ether, chloroform, ethyl acetate, acetone, ethanol, deionized water were studied with parallel extract methods. The inhibitory effects of 6 kinds violet magnolia parallel extracts on hyphae growth and spore germination of *Bocrytis cinerea* Pers. pathogen were studied with growth rate and spores germination methods. The results showed that the extracted rate of deionized water was the largest, which was 25.71%. The smallest was petroleum ether which was 9.63%. 6 kinds solvent parallel extracts had significant antibacterial effects on hyphae growth and spore germination of pathogen. The EC_{50} of petroleum ether, chloroform and deionized water extracts on hyphae growth and spore germination was 372.15 mg/L and 1 318.92 mg/L, 206.83 mg/L and 591.78 mg/L, 6 024.25 mg/L and 3 532.13 mg/L respectively. Indicate that the inhibition effect on hyphae growth was superior to spore germination of organic solvents extracts. And the main inhibiting activity substance of violet magnolia could be extracted by polar organic solvents easily.

Keywords: violet magnolia; parallel extracts; *Bocrytis cinerea* Pers.; inhibition effect