

四种中药提取物对蔬菜病原真菌的抑制作用

侯东耀, 田平芳, 谭天伟

(北京化工大学 生命科学与技术学院 北京 100029)

摘要: 采用生长速率法测定了黄连、雷公藤、青蒿和川楝子乙醇提取物对番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、番茄早疫病菌(*Alternaria solani*)和辣椒炭疽病菌(*Vermicularia capsici*)的抑菌活性。结果表明,在质量浓度为 1 g/mL 时,4 种中药乙醇提取物对 3 种真菌生长均具有一定程度的抑制作用,其中黄连提取物对番茄灰霉病菌的抑菌率为 65%~68%;青蒿和川楝子提取物对辣椒炭疽病菌的抑菌率分别为 63%~85%和 59%~77%;黄连、川楝子和雷公藤提取物对番茄早疫病菌的抑制率分别为 70%~80%、48%~57%和 59%~77%。此外还测定了黄连、川楝子提取物对几种真菌的毒力。该研究为跟踪抗菌活性物质奠定了基础。

关键词: 中草药; 提取液; 蔬菜病原真菌; 抗菌活性

中图分类号: S 481⁺.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)02-0222-03

番茄灰霉(*Botrytis cinerea*)、番茄早疫(*Alternaria solani*)和辣椒炭疽(*Colletotrium ccapsici*)是蔬菜重要病害,目前主要依靠化学防治。由于化学农药残留严重危害人体健康,寻求天然无毒或低毒生物源杀菌剂,一直是农药研发孜孜以求的目标。从药用植物中筛选抑菌活性物质是当前杀菌剂研发的重要思路^[1]。研究测定了黄连等 4 种廉价中草药乙醇提取物对 3 种北京郊区主要蔬菜病原真菌的抑菌活性,并确定了黄连和川楝提取物对 3 种霉菌的毒力,为杀菌剂的筛选和复配提供了依据。

1 材料

材料为黄连(*Coptis chinensis* Franch)、雷公藤(*Tripterygium wilfkrdii* Hook)、青蒿(*Artemisia apia- cea* Hance)、川楝子(*Melia toosendan* Sieb. et Zucc)购自安国市药材市场。供试真菌番茄灰霉(*Botrytis cine- rea*)、番茄早疫(*Alternaria solani*)和辣椒炭疽(*Vermicu- laria capsici*)由北京市农业科学院李兴红老师惠赠。

2 方法

2.1 中药提取物的制备

将 4 种中草药洗净,50℃干燥后粉碎至 30 目,称取粉末 200 g 与 70%乙醇 2 000 mL 一起置入微波提取仪中提取 7 min、离心、抽滤,滤液减压蒸馏至流浸膏。置流浸膏于 200 mL 容量瓶中,无菌水定容(相当于干样 1 g/mL),放入 4℃冰箱待用。

The Species Identification of the Cucumber Root-Knot Nematodes in Helan Mountain Farm of Ningxia

ZHANG Kao-wen¹, JIA Zhen-hua²

(1. College of Life Science and Engineering, the North University for Nationalities, Yinchuan, Ningxia 750021, China; 2. College of Biological Science and Technology, Fuzhou University, Fuzhou, Fujian 350002, China)

Abstract: Based on the morphological characters such as Perineal- striae, juvenile and female adult body length and maximum width, stylet, and DGO, and isoenzyme profiles, 45 populations collected from 9 areas in Helan Mountain region, Ningxia, were identified. There was only one species of root-knot nematode *Meloidogyne. incognita* in those areas. *M. incognita* accounted for the total species of more than 97%, other species was not found yet.

Key words: Root-knot nematodes; Species identification; Esterase phenotype

2.2 生长速率法测定提取物的抑菌活性

取上述母液 5 mL 与 95 mL 的 PDA 固体培养基成分混匀, 灭菌, 倒皿制成固体培养基。无菌条件下, 用 0.6 cm 孔径的打孔器取生长旺盛的菌落边缘, 移入 PDA 平板中。每个处理重复 5 次, 以加 5 mL 去离子水与 95 mL 培养基所制平板作为空白对照。27℃恒温培养, 36 h 后每隔 12 h 测量菌落直径, 以对照菌落长满培养皿为止, 计算抑制率。

菌落直径= 测量菌落直径平均值-0.6; 菌丝生长抑制率=(对照纯生长量-处理纯生长量)/对照菌落直径×100。

2.3 毒力回归方程的建立

选定对 3 种真菌均有较强抑制效果的中草药, 用移液器依次取上述中药提取液 10、5、2.5、1.25、0.625、0.313、0.156 和 0 mL, 各自加入 90 mL 融化培养基(约 60℃)后混匀, 用去离子水补至 100 mL, 使培养基含药浓度依次为 1/10、1/20、1/40、1/80、1/160、1/320、1/640、0 g/mL。121℃消毒 20 min 后(川楝提取物加入到已灭菌且冷却至 60℃的液体培养基, 若同时灭菌会导致培养基不凝固), 倒入直径为 9 cm 培养皿中, 冷却后在平板上接

入被试菌饼($\Phi=0.6\text{ cm}$), 每皿接 1 个菌饼, 每处理重复 3 次, 放入 27℃恒温箱, 番茄灰霉菌培养 72 h, 番茄早疫病、桃褐腐菌和辣椒炭疽菌均培养 120 h, 测抑菌率。根据机率值换算表, 将抑制百分率换算成抑制机率值。以试验中设定的浓度对数为横坐标, 抑制机率值为纵坐标, 采用最小二乘法计算药剂的毒力回归方程和有效浓度 EC_{50} (mg/mL)。

3 结果与分析

3.1 中草药乙醇提取液的抑菌效果

在 120 h 内, 每隔 12 h 测量黄连、雷公藤、青蒿、川楝子乙醇提取物对 3 种真菌菌丝生长的抑制作用(见表 1、2、3、4)。黄连和雷公藤提取物对番茄早疫病菌抑制率分别在 70%和 60%以上。川楝子、青蒿提取物对辣椒炭疽菌的抑菌率达 60%以上。值得提及的是, 黄连对生长迅速的番茄灰霉菌的抑制率竟高于 65%, 而其它 3 种提取液对番茄灰霉的抑菌率小于 50%, 提示黄连存在较强的抑菌活性物质。黄连提取物对辣椒炭疽病原菌的效果不明显, 但川楝子提取物对辣椒炭疽病原菌有强的抑菌效果, 表明抑菌物质靶向的特异性。据此可考虑将黄连和川楝复配, 以扩大抑菌谱。

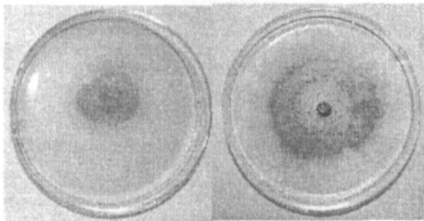


图1 青蒿提取物对辣椒炭疽菌的抑制
注: 左: 生长 120 h; 右: 对照。

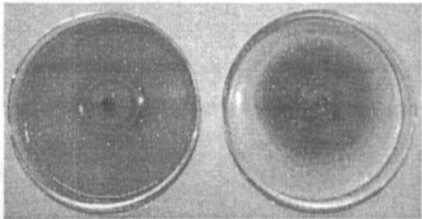


图2 雷公藤提取的对番茄早疫病菌的抑制
注: 左: 生长 120 h; 右: 对照。

表 1 黄连乙醇提取物对 3 种真菌生长的抑制率

病原真菌	抑菌率/ %							
	36 h	48 h	60 h	72 h	84 h	96 h	108 h	120 h
番茄灰霉	68.8	65.4	67.5	74.4	—	—	—	—
辣椒炭疽	31.6	28.9	24.3	23.5	25.4	18.9	16.3	10.0
番茄早疫	70.7	76.7	77.1	80.7	77.8	80.3	80.7	80.7

表 2 川楝子乙醇提取物对 3 种蔬菜病原菌菌丝生长的抑制率

病原真菌	抑菌率/ %							
	36 h	48 h	60 h	72 h	84 h	96 h	108 h	120 h
番茄灰霉	18.8	25.4	27.5	30.4	—	—	—	—
辣椒炭疽	59.3	73.1	77.1	72.1	—	—	—	—
番茄早疫	57.1	54.1	52.1	48.0	50.3	49.4	48.2	48.9

3.2 黄连和川楝子提取物对病原真菌的毒力

为进一步研究黄连和川楝子提取物对病原真菌的

抑菌效果, 分别测定了其毒力(见表 5、6)。2 种提取物在 0~100 mg/mL 范围内, 随着药剂浓度的提高, 其抑菌作用逐渐增强, 菌落扩展速度减慢。其中黄连对番茄灰霉病菌有效中浓度 EC_{50} 为 14.09 mg/mL; 对番茄早疫病菌有效中浓度 EC_{50} 为 27.35 mg/mL。川楝子对辣椒炭疽病菌的有效中浓度为 8.21 mg/mL; 对番茄早疫病病原菌有效中浓度 EC_{50} 为 20.02 mg/mL。

表 3 青蒿乙醇提取物对 3 种蔬菜病原菌菌丝生长的抑制率

病原真菌	抑菌率/ %							
	36 h	48 h	60 h	72 h	84 h	96 h	108 h	120 h
番茄灰霉	17.4	31.3	31.3	34.5	—	—	—	—
辣椒炭疽	85.4	81.0	64.8	68.6	63.0	68.6	73.1	72.4
番茄早疫	31.6	28.5	17.6	21.9	7.0	18.9	13.6	14.0

表 4 雷公藤乙醇提取物对 4 种蔬菜病原菌菌丝生长的抑制率

病原真菌	抑菌率/%							
	36 h	48 h	60 h	72 h	84 h	96 h	108 h	120 h
番茄灰霉	32.6	52.0	50.7	50.1	—	—	—	—
辣椒炭疽	41.5	46.0	46.6	51.2	58.7	52.5	57.3	55.8
番茄早疫	73.7	77.8	64.7	64.9	63.0	66.6	60.9	59.2

注“—”为菌落已接近培养基边缘未测抑菌率

表 5 黄连提取物对 2 种病原菌的毒力

病原真菌	毒力回归方程	$EC_{50}/\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	相关系数 r
番茄灰霉	$Y = 3.3602 + 1.4272X$	14.09	0.9819
番茄早疫	$Y = 3.1894 + 1.2600X$	27.35	0.8848

表 6 川楝子提取物对 2 种病原菌的毒力

病原真菌	毒力回归方程	$EC_{50}/\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	相关系数 r
辣椒炭疽	$Y = 4.2028 + 0.8720X$	8.21	0.9850
番茄早疫	$Y = 3.2472 + 1.3466X$	20.02	0.9840

4 讨论

连续 120 h 的抑菌统计结果显示, 黄连和雷公藤提取液对番茄早疫病菌, 青蒿提取液对辣椒炭疽菌, 均具有长时间的抑制作用。因提取液 pH 值均接近 7, 排除了因酸碱度不适而影响菌丝生长的可能性, 因此推断提取液中存在抑菌活性物质。后续研究可分析其成分并研究其抑菌机理, 涉及细胞分裂或受体与配体之间的信号转导等。文献报道黄连中的小檗碱对多种细菌和部分真菌具有抑制作用^[2-3]。究竟是小檗碱单独发挥作用, 或与其他物质协同抑制菌丝生长尚待研究。就雷公

藤而言, 报道其含有多种杀虫活性成分, 但鲜见杀菌作用的报道。但最近发现的雷公藤红素可抑制癌细胞分裂, 推断也可抑制菌丝细胞的分裂和生长^[4]。尽管关于青蒿抑制真菌的报道很少, 但研究发现它对辣椒炭疽菌有很强的抑制作用。从毒力测定结果看, 黄连等中药具有开发为新农药的可行性。上述结果表明, 传统中药成份小檗碱等在抗植物病原真菌方面具有尚未发现的应用价值。除了探究抑菌机理, 还需考察抑菌活性成分的光稳定性及进行田间试验。此外, 已证实绿原酸、壳寡糖和β-羟基丁酸的杀菌效果^[56], 将该研究中的抑菌物质与壳寡糖等复配, 可望开发出安全广谱的杀菌剂。

参考文献

[1] 吴文君, 高希武. 生物农药及其应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.

[2] Iwasa K, Nanba H, Lee DU, et al. Structure-activity relationships of protoberberines having antimicrobial activities[J]. *Planta Medica*, 1998, 64: 748-751.

[3] Sato F, Hashimoto T, Hachiya A, et al. Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, 98(1): 367-372.

[4] 鲍一笑, 李莉. 雷公藤红素对 HMC-1 细胞凋亡相关基因表达的影响[J]. *第二军医大学学报*, 2001, 22(9): 833-835.

[5] 刘幸海, 李正名, 王宝雷. 具有农业生物活性壳寡糖的研究进展[J]. *农药学学报*, 2006, 8(1): 1-7.

[6] 张永刚, 范志金, 刘秀峰, 等. β-氨基丁酸诱导黄瓜抗黄瓜炭疽病筛选体系的构建[J]. *农药*, 2006, 45(4): 239-242.

Fungistasis of 4 Kinds of Chinese Herb Extracts to Vegetable Pathogenic Fungi

HOU Dong-yao, TIAN Ping-fang, TAN Tian-wei

(College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: Ethanol extracts of four Chinese herbs including *Coptis chinensis*, *Tripterygium wilfordii*, *Artemisia apiacea* and *Melia toosendan*, were obtained by microwave-assisted method. Their inhibitory activities against *Botrytis cinerea*, *Alternaria solani* and *Vermicularia capsici* were tested using growth rate method with concentration of 1 g/mL. The results showed that all ethanol extracts exhibit inhibitory activities, ethanol extract of *Coptis chinensis* effectively inhibited the mycelium growth of *Botrytis cinerea* with 65%~68% inhibitory rate, whereas that of *Artemisia apiacea* and *Melia toosendan* against *Vermicularia capsici* were 63%~85% and 59%~77%, respectively. Besides, *Coptis chinensis*, *Melia toosendan* and *Tripterygium wilfordii* also hampered the growth of *Alternaria solani* with 70%~80%, 48%~57% and 59%~77% inhibitory rates, respectively. Moreover, toxicities of *Coptis chinensis* and *Melia toosendan* to pathogenic fungi were also determined. This study provided the basis for further research to seek the antifungal substances.

Key words: Chinese herb medicines; Extract; Vegetable pathogenic fungi; Inhibitory rate