

126 种中草药提取物对 2 种植物病原真菌的抑制作用

王树桐^{1,2}, 张凤巧³, 高瑞平¹, 甄文超¹, 鲍时翔², 蒋继志¹, 曹克强^{1*}

(1. 河北农业大学植物保护学院, 河北省作物病虫害生物防治工程技术中心, 河北 保定 071001;

2. 中国热带农业科学院生物技术研究所, 热带作物生物技术国家重点实验室, 海南 海口 571101;

3. 河北农业大学图书馆, 河北 保定 071001)

摘要: 以禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)和立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)为供试菌种, 中草药提取物样品供试质量浓度为 0.01g/ml, 用生长速率法对 126 种中草药的乙醇提取物进行了室内抑菌活性测试。结果表明, 在供试的 126 种中草药提取物中, 16 种提取物对禾谷镰刀菌菌丝生长具有显著的抑制作用, 且抑菌作用大于 50%, 甘草提取物的抑菌活性达 86.99%。将这 16 种抑菌活性较好的提取物稀释 200 倍进一步测试, 有 7 种提取物抑菌作用大于 50%。供试的 126 种中草药提取物中有 23 种提取物对立枯丝核菌菌丝生长具有显著的抑制作用, 且抑菌作用大于 50%, 鸡冠花提取物的抑菌率达到 100%。二次筛选后仍有 8 种提取物的抑菌活性大于 60%, 其中鸡冠花提取物的抑菌率仍为 100%。

关键词: 中草药提取物; 禾谷镰刀菌; 立枯丝核菌; 抑菌活性

中图分类号: S432.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-3268(2006)10-0062-04

Inhibition of 126 Kinds of Chinese Herb Extracts Gainst Two Plant Pathogenic Fungi

WANG Shu-tong^{1,2}, ZHANG Feng-qiao³, GAO Rui-ping¹, ZHEN Wen-chao¹,
BAO Shi-xiang², JIANG Ji-zhi¹, CAO Ke-qiang¹

(1. Bio-control Center of Plant Disease and Pests of Hebei Province, College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China; 2. State Key Laboratory of Tropical Crop Biotechnology, Institute of Bioscience and Biotechnology Chinese Academy for Tropical Agricultural Sciences Haikou 571101, China;

3. Library of Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

Abstract: The extracts from hundred and twenty six species of Chinese herbs (CHEs) were tested for the antifungal activities against the mycelium growth of *Fusarium graminearum* and *Rhizoctonia solani*. The concentration 0.01 g/ml was used in the primary screening. The results showed that 16 species of CHEs expressed significant inhibitory effects against the mycelium growth of *Fusarium graminearum*, and the inhibitory effect was over 50%. Inhibitory rate of *Glycyrrhiza yralensis* extract reached up to 87%. Inhibitory rates of 7 species of CHEs were more than 50% after diluted 200 times at the secondary test. At the primary screening test, 23 species of CHEs had significant inhibitory effects against the mycelium growth of *Rhizoctonia solani* with the inhibitory rates over 50%. Inhibitory effect of *Celosia cristata* L. extract reached up to 100%. The inhibitory effects of 8 species in these

收稿日期: 2006-04-17

基金项目: 科技部粮食丰产科技工程(2004BA07); 河北农业大学博士基金; 河北农业大学大学生科技创新基金

作者简介: 王树桐(1975-), 男, 河北定兴人, 副教授, 博士, 华南热带农业大学作物学博士后, 主要从事作物病害无公害防治研究工作。E-mail: bdstwang@163.com

通讯作者: 曹克强(1963-), 男, 河北荣城人, 教授, 博士生导师, 博士, 主要从事植物病害流行与综合防治研究工作。

E-mail: ckq@mail.hebau.edu.cn

23 species of CHEs were still higher than 60% and the effect of *Celosia cristata* L. extract did not reduce at the secondary screening test.

Key words: Chinese herb extract; *Fusarium graminearum*; *Rhizoctonia solani*; Antifungal activity

小麦赤霉病是小麦生产中一种世界性病害,在我国 20 多个省、市均有发生,危害面积达 670 万 hm^2 。近年来,小麦赤霉病在河北省的发生日趋加重,已经成为生产上亟待解决的问题^[1]。棉苗立枯病是棉花生产的严重障碍,国内外发生均较严重。在我国一般发病率为 50%~60%,死苗 5%~10%,严重时病苗率高达 90%^[2]。河南省棉区棉花在生长期各生育期都有可能遇到连阴雨天气,给棉花造成不同程度的危害。目前,生产上主要依靠化学农药防治上述 2 种病害。然而,长期大量使用化学农药带来了种种弊端,如病原菌抗药性的产生,残留毒性以及环境污染等已成为危及人类健康、生态平衡和社会发展的危险因素。

植物是生物活性化合物的天然宝库,其产生的次生代谢产物超过 40 万种,其中,许多次生化学物质具有杀虫和(或)抑菌等生物活性,在医药和农业上有着重要的研究价值^[3]。与化学合成农药相比,植物源农药来源于自然,易于降解。植物材料可以直接用于开发植物源杀菌剂,或者将活性成分作为前体,人工合成新农药,因此,植物源农药的研究具有广阔的发展前景。据报道,在世界范围内已筛选出 2 400 多种对有害生物具有控制作用的高等植物,约占被筛选植物的 10%^[4]。有报道表明,厚朴树(*Magnolia officinalis*)叶的粗提物对立枯丝核菌等 10 种植物病原真菌都具有很强的抑菌活性,并且盆栽和大田试验均显示出较好的防治效果^[5],马尾松提取物对小麦赤霉病菌有一定的抑制作用^[6]。冯俊涛、于平儒等已经从多种植物中提取出对小麦赤霉病菌有抑制作用的植物源抑菌物质,并通过离体和室内试验证明了这些物质有较好的抑菌活性^[7~8]。

本研究在室内条件下,对 126 种中草药的乙醇提取物进行了筛选,测试了乙醇提取物对小麦赤霉病菌和棉花立枯病病菌的抑菌活性,以期筛选出具有较强抑菌活性的中草药提取物,为进一步开发植物源杀菌剂奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试中草药 甘草等 126 种中草药购自河北保定长天大药房。

1.1.2 供试菌种 立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*),禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*),由河北

农业大学植物免疫与综合防治研究室分离自田间病株,经张志铭教授鉴定。

1.2 方法

1.2.1 中草药提取物的制备 取经粉碎的干燥植物材料 20g,加 80%乙醇 200ml,超声波提取 20min,然后经 4 500r/min 离心 20min,3 层纱布过滤,取上清液。50℃下,旋转蒸发至干,残余物溶于 20ml 80%乙醇中作为母液(CHEs),4℃下保存备用^[9]。

1.2.2 抑菌活性的初步测定 采用生长速率法^[10]测定中草药提取物对病菌菌丝生长的抑制作用。取上述母液 1 ml 和链霉素 1 ml(浓度为 0.0044 g/ml)^[11]与 100 ml PDA 培养基混合均匀制成 1%的带药培养基,倒皿,待冷却后,在平板中央接直径 0.6 cm 的禾谷镰刀菌菌片或立枯丝核菌菌片。每个处理重复 4 次,以加 1 ml 80%酒精和 1 ml 链霉素的 PDA 培养基作对照(ck)。置于 25℃恒温培养箱内培养。约 5 d 后,待对照菌长满皿时,用十字交叉法测量菌落直径大小(单位 mm),并计算抑制百分率^[12]。

$$\text{抑菌百分率} = \frac{(\text{对照组菌落直径} - \text{处理组菌落直径})}{\text{对照组菌落直径}} \times 100\%$$

1.2.3 采用生长速率法对抑菌效果大于 50%的中草药提取物的二次筛选 二次筛选时每 100ml 培养基中加入 0.5ml 待测提取物和 1 ml 链霉素,对照组的培养基加 0.5ml 80%酒精和 1ml 链霉素,方法同 1.2.2。

1.2.4 试验数据统计分析 试验结果采用 Microsoft Excel 软件进行数据整理,经 DPS (DATA PROCESSING SYSTEM)统计软件 LSD 法进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 中草药提取物抑菌活性的初步筛选

经过初步筛选,测定了 126 种中草药的 80%乙醇抽提物(质量浓度为 0.01 g/ml)对禾谷镰刀菌、立枯丝核菌菌丝生长的抑制作用。将对 2 种植物病原真菌具有显著抑制作用,且抑菌率达到 50%以上的中草药提取物列于表 1。在供试的 126 种中草药提取物中,16 种提取物对禾谷镰刀菌菌丝生长的抑制效果达到 50%以上,甘草提取物的抑菌活性最强,达到了 86.99%。23 种提取物对立枯丝核菌的抑制作用达到 50%以上,鸡冠花提取物的抑制作用最强,达到了 100%。而甘草、石见穿、益智仁、黄精、何首乌、猫爪草、鸡冠花、地锦草、月季花、鱼腥草

表 1 对禾谷镰刀菌和立枯丝核菌菌丝生长具较强抑制作用的中草药提取物

中草药名称	学名	对禾谷镰刀菌 抑菌百分率 (%)	中草药名称	学名	对立枯丝核菌 抑菌百分率 (%)
甘草	<i>Glycyrrhiza yralensis</i>	86.99	鸡冠花	<i>Celosia cristata</i> L.	100.00
石见穿	<i>Salvia chinensis</i> Benth	73.58	猫爪草	<i>Ranunculus ternatus</i>	82.05
牵牛子	<i>Ipomoea hederacea</i>	72.29	合欢花	<i>Albizia julibrissin</i>	81.05
益智仁	<i>Alpinia oxyphylla</i>	69.10	鱼腥草	<i>Houttuynia cordata</i> Thunb	79.18
黄精	<i>Polygonatum sibiricum</i>	65.45	桃仁	<i>Prunus persica</i>	76.71
何首乌	<i>Polygonum multiflorum</i>	65.07	茯苓	<i>Poria cocos</i>	75.85
猫爪草	<i>Ranunculus ternatus</i>	63.46	月季花	<i>Rosa chinensis</i>	74.91
卢巴子	<i>Semen perscae</i>	60.69	密蒙花	<i>Buddleja officinalis</i>	74.39
土荆皮	<i>Pseudolarix kaempferi</i>	60.13	褐虱	<i>Carpesium abrotanoides</i>	73.53
罗布麻	<i>Apocynum venetum</i>	59.74	橘红	<i>Citrus reticulata</i>	71.01
鸡冠花	<i>Celosia cristata</i> L.	57.55	何首乌	<i>Polygonum multiflorum</i>	70.70
地锦草	<i>Euphorbia humifusa</i>	57.14	威灵仙	<i>Clematis chinensis</i> Osbeck	69.57
月季花	<i>Rosa chinensis</i>	56.49	女贞子	<i>Ligustrum lucidum</i>	69.55
鱼腥草	<i>Houttuynia cordata</i> Thunb	55.30	石见穿	<i>Salvia chinensis</i> Benth	60.22
山药	<i>Dioscorea opposeta</i>	54.18	鸭胆子	<i>Brucea javanica</i>	59.18
荔枝皮	<i>Litchi chinensis</i> Sonn	50.83	黄精	<i>Polygonatum sibiricum</i>	56.73
女贞子	<i>Ligustrum lucidum</i>	47.17	郁李	<i>Prunus japonica</i> Thunb	55.90
郁李	<i>Prunus japonica</i> Thunb	45.45	旋复花	<i>Imula japonica</i>	54.37
威灵仙	<i>Clematis chinensis</i> Osbeck	40.38	青蒿	<i>Artemisia apiacea</i> Hance	52.92
青蒿	<i>Artemisia apiacea</i> Hance	39.29	益智仁	<i>Alpinia oxyphylla</i>	51.92
合欢花	<i>Albizia julibrissin</i>	35.03	甘草	<i>Glycyrrhiza yralensis</i>	51.91
鸭胆子	<i>Brucea javanica</i>	32.28	地锦草	<i>Euphorbia humifusa</i>	51.60
褐虱	<i>Carpesium abrotanoides</i>	25.16	山药	<i>Dioscorea opposeta</i>	50.90
橘红	<i>Citrus reticulata</i>	23.51	荔枝皮	<i>Litchi chinensis</i> Sonn	42.95
旋复花	<i>Imula japonica</i>	21.43	牵牛子	<i>Ipomoea hederacea</i>	34.31
密蒙花	<i>Buddleja officinalis</i>	18.87	卢巴子	<i>Semen perscae</i>	32.18
桃仁	<i>Prunus persica</i>	1.60	罗布麻	<i>Apocynum venetum</i>	24.84
茯苓	<i>Poria cocos</i>	-1.60	土荆皮	<i>Pseudolarix kaempferi</i>	17.09

和山药共 11 种中草药提取物对 2 种病原真菌菌丝生长的抑制作用均达到 50% 以上。

2.2 抑菌活性大于 50% 的中草药提取物的二次筛选

利用生长速率法将表 1 中抑菌活性大于 50% 的提取物稀释 200 倍进行二次筛选测试, 结果见表 2 和表 3。在对禾谷镰刀菌菌丝生长的抑制作用测试中, 供试的 16 种提取物均具有极显著的抑制作用, 其中卢巴子、鸡冠花、月季、黄精、猫爪草、益智仁和石见穿共 7 种提取物的抑菌活性高于 50% (表 2)。在立枯丝核菌菌丝生长抑制作用测试中, 供试的 23 种提取物中有 22 种具有极显著的抑制作用, 其中鸡冠花提取物的抑菌活性仍为 100%, 另外, 合欢花、茯苓、女贞子、猫爪草、密蒙花、月季花、桃仁和鱼腥草共 8 种提取物的抑菌活性高于 50% (表 3)。只有月季、鸡冠花和猫爪草 3 种提取物对 2 种植物病原真菌的抑制作用均达到了 50% 以上。

3 结论与讨论

本试验中, 在所供试浓度下经过二次筛选, 卢巴子、鸡冠花和月季花等 7 种中草药提取物对禾谷镰

表 2 对禾谷镰刀菌菌丝生长具抑制作用提取物的二次筛选

中草药名称	菌落直径 (mm)	显著性检验		抑制百分率 (%)
		0.05	0.01	
卢巴子	29.0±0.8	f	E	60.00
鸡冠花	31.0±0.0	f	E	57.24
月季花	32.0±1.2	f	E	55.86
牵牛子	44.8±1.7	e	D	38.28
鱼腥草	46.8±2.2	de	D	35.52
罗布麻	48.5±1.0	d	D	33.10
甘草	53.8±4.6	c	C	25.86
何首乌	62.8±1.3	b	B	13.45
CK	72.5±2.5	a	A	—
黄精	26.8±1.7*	e	E	63.85*
猫爪草	27.8±1.0*	e	E	62.50*
益智仁	30.0±0.8*	e	E	59.46*
石见穿	28.3±1.3*	e	E	61.82*
土荆皮	37.8±3.5*	d	D	48.99*
荔枝皮	45.0±2.0*	c	C	39.19*
地锦草	48.0±2.9*	c	C	35.14*
山药	65.3±1.3*	b	B	11.82*
ck	74.0±6.4*	a	A	—

注: 表中有 * 号的部分分别为不同批次试验结果, 下同

表3 对立枯丝核菌菌丝生长具抑制作用提取物的二次筛选

中草药名称	菌落直径 (mm)	显著性检验		抑制百分率 (%)
		0.05	0.01	
合欢花	16.3±1.0	f	E	77.11
茯苓	27.3±1.0	e	D	61.62
褐虱	51.5±4.5	d	C	27.46
何首乌	55.8±1.7	c	C	21.48
甘草	60.3±2.5	b	B	15.14
郁李	62.5±1.3	b	B	11.97
橘红	73.3±0.5	a	A	—3.17
ck	71.0±2.2	a	A	—
鸡冠花	0.0±0.0*	g	G	100.00*
猫爪草	17.5±0.6*	f	F	74.82*
女贞子	23.0±1.2*	e	E	66.91*
密蒙花	23.8±0.5*	e	E	65.83*
月季花	30.0±1.2*	d	D	56.83*
黄精	37.8±1.0*	c	C	45.68*
青蒿	45.5±3.7*	b	B	34.53*
ck	69.5±0.6*	a	A	—
桃仁	19.3±1.0*	e	F	73.72*
鱼腥草	19.5±1.0*	e	F	73.38*
旋复花	40.8±1.4*	d	E	44.37*
鸭胆子	42.3±0.6*	d	E	42.32*
益智仁	43.0±0.5*	d	DE	41.30*
石见穿	43.3±6.4*	d	DE	40.96*
地锦草	47.5±1.5*	c	CD	35.15*
威灵仙	49.3±2.6*	c	C	32.76*
山药	63.3±1.3*	b	B	13.65*
ck	73.3±1.5*	a	A	—

刀菌菌丝生长的抑制活性大于 50 %; 鸡冠花、合欢花和茯苓等 9 种提取物对立枯丝核菌菌丝生长的抑制作用大于 50 %, 鸡冠花提取物 2 次筛选的结果抑菌率均为 100 %。综合分析认为, 月季花、鸡冠花和猫爪草 3 种提取物在 2 次筛选中对 2 种病原真菌均表现出较强的抑制作用, 值得进一步深入研究。

在本研究中发现, 部分提取物对 2 种植物病原真菌的抑制作用差异很大。如牵牛子提取物对禾谷镰刀菌的抑制作用为 72.29 %, 但在同等浓度下对立枯丝核菌的抑制作用只有 34.31 %。茯苓、桃仁、旋复花和橘红提取物对立枯丝核菌的抑制作用均达到 70 % 以上, 但是对禾谷镰刀菌的抑制作用却很低, 甚至没有表现任何抑制作用。如果与不同植物所含活性成分进行对照分析, 或许可以发现活性成分结构与抑菌作用之间的相关性, 从而为进一步探讨构效关系奠定基础。然而, 对于多数植物材料, 还没有确定何种成分是植物病原菌的主要抑菌成分。因此, 分离和鉴定植物材料中的抑菌活性成分将是下一步研究的重要方向。

与于平儒等在研究中所遇到的问题一样, 在试验设计中考虑到溶剂毒性以及操作方便等要求, 在植物样品的提取、定容及生物活性测定中均选用医

用乙醇为溶剂, 可能难以把植物中的生物活性物质全部提取出来。且部分植物样品没有把根、茎、叶等分开提取, 这样就可能掩盖各部位成分在抑菌活性方面的差异^[7, 8]。植物样品提取液的供试质量浓度为 10 mg /ml 和 5 mg /ml, 某些含量少的生物活性物质就难以表现出来。提取液中若存在离体条件下无活性而活体条件下高活性的化学物质, 也会因未作活体试验而被漏筛。试验中仅选了 2 种较有代表性的真菌, 今后还将进一步扩大筛选范围。

本研究所获得的有效样品的杀菌谱、作用方式和作用机制以及在活体上的防治效果, 均有待于进一步研究和探讨。

参考文献:

[1] 纪莉景, 胡同乐, 王树桐. 河北省中南部地区小麦赤霉病发生调查[A]. 河北省植物保护研究进展[C]. 北京: 中国农业科技出版社, 2004. 94—99.

[2] 周光胜, 孙晓阳, 邓先明. 棉花种衣剂对防治棉苗立枯病试验研究[J]. 云南农业大学学报, 2000, 15(3): 234—236.

[3] Swain T. Secondary compound as protective agents[J]. Am Rev Plant Physical, 1977, 28: 479—501.

[4] 何衍彪, 詹儒林, 赵艳龙. 植物源农药的研究和应用[J]. 热带农业科学, 2004, 24(3): 48—56.

[5] 赵纯森, 黄俊斌, 周茂繁. 厚朴叶中抑菌活性成分鉴别及其防病效果[J]. 华中农业大学学报, 1994, 13(4): 373—377.

[6] 张应焱, 尹彩萍, 李晓红, 等. 7 种植物提取物对几种病菌生物活性的初步研究[J]. 井冈山师范学院学报(自然科学), 2004, 25(6): 59—60.

[7] 冯俊涛, 祝木金, 于平儒. 西北地区植物源杀菌剂初步筛选[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2002, 30(6): 129—137.

[8] 于平儒, 邵红军, 冯俊涛. 62 种植物样品对菌丝活性的测定[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2001, 29(6): 65—69.

[9] WANG S T, WANG X Y, LIU J L, *et al.* Screening of Chinese herbs for the fungitoxicity against *Phytophthora infestans*[J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 2001, 24(2): 101—107.

[10] 刘均玲, 曹克强, 司丽丽. 植物提取物在活体上对番茄灰霉病抑制作用的研究[A]. 河北省植物病理学研究[C]. 北京: 中国农业出版社, 2003. 237—240.

[11] 刘晓芸, 王树桐, 孔俊英, 等. 对马铃薯晚疫病有防治效果的植物提取物的筛选[A]. 河北省植物保护研究进展[C]. 北京: 中国农业科技出版社, 2004. 117—121.

[12] 王树桐, 胡同乐, 王晓燕, 等. 对番茄灰霉病菌有抗菌活性的植物提取物的室内筛选[J]. 河北农业大学学报, 2003, 26(1): 61—64.