

厚朴提取液对 5 种药用植物病原菌的抑菌活性研究

刘莹¹, 周如军¹, 傅俊范^{1*}, 严雪瑞¹, 郝宁²

(1. 沈阳农业大学 植物保护学院, 辽宁 沈阳 110161; 2. 沈阳农业大学 园艺学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘要: 采用生长速率法和悬滴法, 测试了厚朴乙酸乙酯提取液对人参锈腐病菌(*Cylindrocarpon destrustans*)、人参黑斑病菌(*Alternaria panax*)、五味子根腐病菌(*Fusarium oxysporum*)、穿山龙黑斑病菌(*Alternaria dioscoreae*)和紫草白霉病菌(*Ramularia lithospermi*) 5 种药用植物病害致病菌的离体抑菌活性。结果表明: 厚朴提取液对以上病原菌都有一定的抑制作用, 对于同一种病原菌来说, 厚朴提取液对其孢子萌发的抑制效果好于对其菌丝生长的抑制效果。在相同的供试浓度下, 厚朴提取液对紫草白霉病菌的菌丝生长抑制效果最好, 试验中还发现, 当浓度大于 0.5mg/mL 时, 对人参黑斑病菌的孢子萌发抑制效果最好。

关键词: 药用植物; 厚朴提取液; 植物病原菌; 抑菌活性; 抑菌率

中图分类号: S476⁺.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2009)05-0086-04

Antibiotic Activity of Crude Extracts from *Magnolia officinalis* to Five Medicinal Plant Pathogens

LIU Ying¹, ZHOU Ru-jun¹, FU Jun-fan^{1*}, YAN Xue-rui¹, HAO Ning²

(1. College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China;

2. College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: The ethyl acetate extracts from *Magnolia officinalis* were test for their inhibition activity by using plate growth rate method and hanging drop method to *Cylindrocarpon destrustans*, *Alternaria panax*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria dioscoreae* and *Ramularia lithospermi*. The results showed that the ethyl acetate extracts of *Magnolia officinalis* had significant antibacterial activity for tested pathogens. For the same plant pathogenic fungi, the ethyl acetate extracts of *Magnolia officinalis* had better inhibitory of spore germination than the inhibitory effect of mycelium growth. For the same concentration, the best result was the extract of *Magnolia officinalis* to inhibit the growth of *Ramularia lithospermvi* mycelium. We also found that the ethyl acetate extracts density more than 0.5mg/mL had the best antibacterial activity of spore germination of *Alternaria panax*.

Key words: Medicinal plants; Magnolol extract; Plant pathogenic fungi; Antimicrobial activity; Bacteriostasis rate

随着科学技术突飞猛进的发展和人类对食品安全要求日益增高, 植物源农药的研发倍受人们的关

注与青睐, 从植物中寻找抑菌、杀菌活性物质以研究开发植物源农药是目前农药研究领域的热点之

收稿日期: 2008-11-12

基金项目: 辽宁省自然科学基金项目(20052120)

作者简介: 刘莹(1984-), 女, 辽宁沈阳人, 在读硕士研究生, 研究方向: 药用植物病理学。E-mail: liuying1984723@163.com

通讯作者: 傅俊范(1958-), 男, 辽宁朝阳人, 教授, 博士生导师, 主要从事药用植物病理学和植物病害流行学研究。

—^[1]。近年来,我国药用植物栽培面积不断增加,但随之而来的药用植物病害也日趋严重。按照 GAP 管理规范^[2],中药材从栽培到收获及贮藏全过程对农药残留量的要求都非常严格。药用植物厚朴 (*Magnolia officinalis* Rehd. et Wils) 属木兰科植物,为我国重要的中药材,别名厚皮、油朴、烈朴、赤朴等,是常用的皮类中药材,除具有燥湿消痰、下气除螨等功效^[3]外,还具有抗菌作用,其抗菌物质主要有酚类、挥发油、生物碱等。本试验主要研究厚朴提取液对 5 种药用植物中较常见且发病较重病害的抑制作用,为寻找其有效先导化合物奠定基础。

1 材料和方法

1.1 供试材料

植物材料: 中药厚朴购于沈阳成大方圆药店; 供试菌种: 人参锈腐病菌 (*Cylindrocarpon destrustans*)、人参黑斑病菌 (*Alternaria panax*)、五味子根腐病菌 (*Fusarium oxysporum*)、穿山龙黑斑病菌 (*Alternaria dioscoreae*) 和紫草白霉病菌 (*Ramularia lithospermi*), 均由沈阳农业大学植病流行研究室提供。

1.2 试验方法

1.2.1 厚朴提取液的制备 将烘干后的厚朴样品粉碎过筛(孔径 0.37mm), 称取粉末 90 g, 加 800mL 乙酸乙酯, 分装于 250mL 三角瓶中, 采用 3 次浸渍提取法^[4,5], 合并 3 次滤液, 减压抽滤, 旋转蒸发仪浓缩至 3000mg/mL, 回收溶剂, 将得到的提取物密封, 置 4℃ 冰箱中保存备用。

1.2.2 药液的配制 菌丝生长抑制试验和孢子萌发抑制试验药液的配制: 将 3000mg/mL 的提取原液用乙酸乙酯分别稀释成 1600 mg/mL、800 mg/mL、400 mg/mL、200 mg/mL、100mg/mL、50mg/mL 共 6 个梯度, 密封并置 4℃ 冰箱中保存备用。

1.2.3 抑菌活性测定方法

1.2.3.1 生长速率法^[4] 以生长速率法测定厚朴提取液对 5 种病原菌菌丝生长的抑制作用。所用培养基为 PDA 培养基。取 1.2.2 中稀释得到的 6 个浓度梯度药液 1 mL 与 99mL PDA 培养基均匀混合制成 1% 的带药培养基(药液终浓度分别为 16 mg/mL、8mg/mL、4mg/mL、2mg/mL、1mg/mL、0.5mg/mL), 倒入直径为 90mm 的培养皿中, 待冷却后, 接入直径为 4mm 的菌饼, 每处理重复 3 次, 以加入乙酸乙酯溶液的 PDA 培养基作为空白对照(CK)。置于 25℃ 恒温培养箱培养 4d 后采用十字交叉法测得菌落直径, 并计算抑菌率。

菌落生长直径 = 2 次直径平均值 - 4.0

$$\text{菌丝生长抑制率} = \frac{\text{对照菌落生长直径} - \text{处理菌落生长直径}}{\text{对照菌落生长直径}} \times 100\%$$

1.2.3.2 悬滴法^[5] 采用悬滴法, 测定厚朴提取液对 5 种病原菌孢子萌发的抑制作用。每处理重复 3 次, 以不加药液的孢子悬浮液作为对照, 将涂好的载玻片放在垫有湿润滤纸的培养皿内, 放入 25℃ 恒温培养箱培养 8~12h (芽管长度大于孢子短半径视为萌发), 调查孢子萌发情况。

$$\text{萌发率} = \frac{\text{孢子萌发数}}{\text{检查孢子总数}} \times 100\%$$

$$\text{孢子萌发抑制率} = \frac{\text{对照萌发率} - \text{处理萌发率}}{\text{对照萌发率}} \times 100\%$$

1.2.4 统计分析 试验结果采用 DPS (Data Processing System) 统计软件进行方差分析。

1.2.5 厚朴提取液对 5 种病原菌的室内毒力测定 利用 1.2.3 中厚朴提取液的 6 个不同浓度对病原菌菌丝生长的抑制作用, 计算抑菌率, 建立毒力回归方程, 将抑菌百分率转换成几率值, 浓度转换成对数, 进行几率值分析, 求出厚朴乙酸乙酯提取液对不同病原菌的抑制中浓度 (EC₅₀)。

2 结果与分析

2.1 厚朴提取液对植物病原菌菌丝生长的抑制作用

2.1.1 厚朴提取液对 5 种病原菌菌丝生长的抑制率 从表 1 可以看出, 厚朴提取液对人参锈腐病菌、人参黑斑病菌、五味子根腐病菌、穿山龙黑斑病菌、紫草白霉病菌的菌丝生长都有较好抑制作用, 并且在同一浓度下, 厚朴提取液对不同致病菌的抑制效果不同, 如浓度为 16 mg/mL 时, 提取液对人参锈腐病菌的菌丝生长抑制率为 79.93%, 而对紫草白霉病菌的菌丝生长抑制率高达 97.08%。此外, 当药液浓度在 4mg/mL 以上时, 提取液对 5 种病原菌的菌丝生长抑制率均达到 65% 以上; 药液浓度在 1mg/mL 以上时, 提取液对人参黑斑病菌和紫草白霉病菌的菌丝生长抑制率均达到 64% 以上。

2.1.2 厚朴提取液对 5 种病原菌菌丝生长的室内毒力测定 通过几率值分析, 可以求出厚朴提取液对 5 种不同病原菌菌丝生长的抑制中浓度 (EC₅₀), 从表 2 可以看出, 厚朴提取液对紫草白霉病菌和人参黑斑病菌的菌丝生长抑制效果较好, 厚朴提取液的 EC₅₀ 分别为 0.29mg/mL 和 0.34 mg/mL, 次之为穿山龙黑斑病菌和五味子根腐病菌, 提取液的 EC₅₀ 分别为 0.67mg/mL 和 0.76mg/mL, 最后为人

表 1 厚朴提取液对 5 种病原菌的菌丝生长抑菌率 (%)

病原菌	厚朴提取液浓度(mg/mL)					
	16	8	4	2	1	0.5
人参锈腐病菌	79.93	73.06	65.88	56.90	43.09	22.46
人参黑斑病菌	89.42	83.99	77.64	70.18	64.75	39.57
五味子根腐病菌	86.70	82.03	73.51	68.87	50.17	33.67
穿山龙黑斑病菌	87.70	82.46	74.38	69.06	53.56	35.59
紫草白霉病菌	97.08	93.29	86.07	82.09	72.84	61.93

表 2 厚朴提取液对 5 种病原菌菌丝生长的室内毒力测定结果

病原菌	毒力回归方程	相关系数	EC ₅₀ (mg/mL)	EC ₉₀ (mg/mL)
人参锈腐病菌	y=0.3559x+4.8791	0.9883	1.40	51.42
人参黑斑病菌	y=0.3182x+5.3412	0.9925	0.34	19.21
五味子根腐病菌	y=0.3809x+5.1026	0.9613	0.76	22.08
穿山龙黑斑病菌	y=0.3718x+5.1516	0.9817	0.67	20.89
紫草白霉病菌	y=0.4559x+3.4671	0.9804	0.29	4.79

参锈腐病菌, 提取液的 EC₅₀ 为 1.40 mg/mL。

2.2 厚朴提取液对 5 种病原菌孢子萌发的抑制作用

2.2.1 厚朴提取液对 5 种病原菌孢子萌发的抑制率 在实验室条件下测定了厚朴提取液对人参锈腐病菌、人参黑斑病菌、五味子根腐病菌、穿山龙黑斑病菌、紫草白霉病菌 5 种病原菌孢子萌发的影响。从表 3

可以看出, 厚朴提取液在浓度为 16 mg/mL 时, 对 5 种病原菌孢子萌发抑制率均达到 100.00%, 当提取液浓度降为 0.5 mg/mL 时, 对 5 种药用植物病害病原菌孢子萌发抑制率仍达到了 60% 以上, 其中对人参黑斑病菌和穿山龙黑斑病菌的孢子萌发抑制率均达到了 70% 以上。

表 3 厚朴提取液对 5 种病原菌孢子萌发的抑制率 (%)

病原菌	厚朴提取液浓度(mg/mL)					
	16	8	4	2	1	0.5
人参锈腐病菌	100.00	99.86	97.93	89.97	80.56	61.39
人参黑斑病菌	100.00	99.90	98.52	93.97	82.72	71.59
五味子根腐病菌	100.00	98.62	96.57	88.87	76.14	60.76
穿山龙黑斑病菌	100.00	99.37	97.04	89.38	78.56	72.16
紫草白霉病菌	100.00	99.53	97.46	89.50	79.14	62.53

2.2.2 厚朴提取液对 5 种病原菌孢子萌发的室内毒力测定 根据表 4 结果, 求出了厚朴提取液对 5 种药用植物病原菌孢子萌发的抑制中浓度 (EC₅₀), 从表 4 可以看出, 厚朴提取液对穿山龙黑斑病菌和人参黑斑病菌的孢子萌发抑制效果较好, 厚朴提取

液的 EC₅₀ 分别为 0.28 mg/mL 和 0.32 mg/mL, 其次为五味子根腐病菌和紫草白霉病菌, 厚朴提取液的 EC₅₀ 分别为 0.35 mg/mL 和 0.37 mg/mL, 最后为人参锈腐病菌, 提取液的 EC₅₀ 为 0.42 mg/mL。

表 4 厚朴提取液对 5 种病原菌孢子萌发的室内毒力测定

病原菌	毒力回归方程	相关系数	EC ₅₀ (mg/mL)	EC ₉₀ (mg/mL)
人参锈腐病菌	y=0.9488x+5.8343	0.9766	0.42	1.60
人参黑斑病菌	y=0.9048x+6.0392	0.9776	0.32	1.32
五味子根腐病菌	y=0.7170x+5.7485	0.9959	0.35	2.10
穿山龙黑斑病菌	y=0.7084x+5.9105	0.9684	0.28	1.69
紫草白霉病菌	y=0.8219x+5.8172	0.9914	0.37	1.76

3 结论与讨论

研究表明, 厚朴提取液对 5 种药用植物病原菌

的菌丝生长和孢子萌发均有较好的抑制作用, 其中对紫草白霉病菌和人参黑斑病菌的菌丝生长抑制效果较好, 厚朴提取液的 EC₅₀ 分别为 0.29 mg/mL 和

0.34 mg/mL, 对穿山龙黑斑病菌和人参黑斑病菌的孢子萌发抑制效果较好, 提取液的 EC_{50} 分别为 0.28 mg/mL 和 0.32 mg/mL, 提取液对孢子萌发的抑制效果好于对菌丝生长的抑制效果。

近年来, 我国许多学者对药用植物源杀菌剂的抑菌活性也进行了多方面的研究, 研究对象大多为园艺和大田植物病害。如朱立成等利用丁香等 3 种药用植物提取液来抑制多种植物病原菌, 均取得较好的抑制效果^[6~10]。本试验则是立足于采用药用植物提取液来抑制几种近年来发生较为严重的药用植物病害, 为生物农药的进一步开发推广提供理论依据。试验表明, 药用植物厚朴提取液对 5 种药用植物病害致病菌均有一定的抑制作用, 且效果显著, 可对厚朴抑菌活性成分的提取、分离和纯化进行更深入的研究, 以开发出具有较高应用价值且无公害的植物源农药。

参考文献:

[1] 薛伟, 宋宝全, 周霞, 等. 抗菌植物的研究新进展[J]. 农药, 2005, 44(6): 241—246.
[2] 傅俊范. 药用植物病害防治手册[M]. 沈阳: 辽宁科学

技术出版社, 1999.
[3] 谢凤勋, 胡廷松. 中药原色图谱及栽培技术[M]. 北京: 金盾出版社, 1995.
[4] 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, 1987: 141—145.
[5] 方中达. 植物病理研究方法[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998.
[6] 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.
[7] 宫毓静, 安汝国, 虞惠, 等. 164 种中药乙醇提取物抗真菌作用研究[J]. 中草药, 2002, 33(1): 42—47.
[8] 李永刚, 文景芝. 30 种中药抑菌活性的筛选试验初报[J]. 植物保护学报, 2003, 30(1): 109—110.
[9] Wang W Q, Ben-Daniel B H. Control of plant diseases by extracts of *Inula viscosa*[J]. Phtopathology, 2004, 94: 1042—1047.
[10] Cohen Y, Wang W Q, Ben-Daniel B H, *et al.* Extracts of *Inula viscosa* control downy mildew of grapes caused by *Plasmopara viticola*[J]. Phytopathology, 2006, 96: 417—424.

本刊常用单位符号及换算

依据国家标准, 本刊在刊发稿件中一律使用法定计量单位, 为便于读者阅读, 现将本刊常用单位符号及其换算方法介绍如下:

- 1 长度单位: km= 公里、千米 m= 米, cm= 厘米, mm= 毫米; 换算: 1 km=1 000m, 1 m= 100cm= 3 尺, 1 cm= 10 mm
- 2 重量单位: t= 吨或 1 000 kg, kg= 公斤、千克, g= 克, mg= 毫克; 换算: 1 t= 1 000kg, 1 kg= 1 000 g, 1 g= 1 000mg, 500g= 1 市斤, 50g= 1 两
- 3 面积单位: m²= 平方米, hm²= 公顷, cm²= 平方厘米; 换算: 1 hm²= 10 000 m²= 15 亩, 1 亩= 667 m²
- 4 浓度单位: 1 mg/kg, mg/L 或 mg·kg⁻¹, mg·L⁻¹, μL·L⁻¹= 1×10⁻⁶= 1ppm, 即百万分之一, 不用 ppm 和 1×10⁻⁶表示
- 5 时间单位: “天、小时、分钟、秒”分别用“d, h, min, s”表示

(本刊编辑部)