

鹿蹄草等中草药对水果褐腐病菌(*Monilinia fructicola*)的抑制作用

吴小虎¹, 艾启俊^{2,*}, 于庆华², 牛 巍²

(1. 北京农学院植物科技系, 北京 102206; 2. 北京农学院食品科学系, 北京 102206)

摘 要: 筛选出鹿蹄草、厚朴、虎杖等 7 种中草药, 探讨其单剂及复配组合对水果褐腐病菌的抑制作用。方法: (1) 各中草药水煎浸提, 生长速率法测定各药液对褐腐病菌生长抑制率的大小; (2) 等倍稀释法测定对褐腐病菌抑制作用较好的几种中草药复配组合的最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC); (3) 扫描电镜观察增效组合 MIC 和 MBC 作用下褐腐病菌的菌丝形态。结果: (1) 各单剂及复配组合对褐腐病菌均有不同程度的抑制作用, 复配组合中, 以 11 号(鹿蹄草+厚朴+大黄)、14 号(鹿蹄草+高良姜+虎杖)、21 号(鹿蹄草+虎杖+大黄)组合效果最好, 10mg/ml 浓度的抑制率分别达到 89.77%、85.50% 和 85.02%; (2) 三种组合的 MIC 分别是 1.25、2.5、1.25mg/ml; MBC 分别是 2.5、5.0、5.0mg/ml; (3) 电镜观察发现, 增效中草药组合 11 号 MIC 和 MBC 作用下, 褐腐病菌菌丝数量减少, 出现断裂, 且部分消融。

关键词: 鹿蹄草; 中草药; 褐腐病菌; 抑制作用

The Inhibition of Chinese Herbs Containing *Pyrola Rotundifolia* L. against *Monilinia fructicola* in Fruits

WU Xiao-hu¹, AI Qi-jun^{2,*}, YU Qing-hua², NIU Wei²

(1. Department of Plant Science, Beijing Agricultural College, Beijing 102206, China;

2. Department of Food Science, Beijing Agricultural College, Beijing 102206, China)

Abstract: *Pyrola Rotundifolia* L., *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils., *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. etc 7 kinds of Chinese herbs were screened and to research inhibition of single and combined herbs against *Monilinia fructicola* in fruits. Methods: (1) Chinese herbs were extracted with hot water, inhibitory rates were determined by the growth rates of mycelium of *Monilinia fructicola*; (2) Determining MIC and MBC of some high inhibitory rates of combined herbs by plate methods; (3) The observation on ultrastructure of its configuration of mycelium at MIC and MBC. Results: (1) Each medicine has bacteriostatic activities against *Monilinia fructicola*, combined Chinese herbs No.11, No.14, No.21 showed the high inhibiting rates than others, with 89.77%, 85.50%, 85.02% respectively; (2) MIC is 1.25, 2.5, 1.25mg/ml, MBC is 2.5, 5.0, 5.0mg/ml respectively. (3) No. 11 combined Chinese herb at concentration of MIC and MBC induced decrease of mycelium, and some of it breaks into small parts and even melts.

Key words: *Pyrola Rotundifolia* L.; Chinese herbs; *Monilinia fructicola*; inhibition

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)12-0230-04

褐腐病又名菌核病、果腐病、实腐病, 是引起桃、杏、李、樱桃、梅等核果类腐烂的主要病害。我国从南到北各桃、杏、李产区均有发生, 常引起贮藏、运输和销售中的大量烂果, 损失严重^[1~3]。为了防治该病菌, 目前使用的化学药剂有甲基硫菌灵、博舒、多菌灵、代森锌、苯菌灵、福代锌、扑海因、

炭疽福美和多病灵等^[4]。然而, 长期使用化学药剂会导致病菌产生抗药性而降低防病效果, 更严重的是, 生产上频繁使用高浓度化学药剂造成果品上农药残留量增加会威胁人类健康。

众所周知, 中草药中含有许多自然杀菌成分, 适宜的中草药成分之间存在抗菌性的协同增效作用, 药物

收稿日期: 2006-08-20

*通讯作者

基金项目: 北京市自然科学基金资助项目(6042005)

作者简介: 吴小虎(1979-), 男, 硕士研究生, 主要从事果品采后生理与保鲜方面的研究。

配伍协同作用是增加抗菌效价的一种有效途径^[5]。为了提高中草药的抑菌效果、降低使用浓度,笔者从13种含有抗真菌成分的中草药中筛选出7种,测定该7种中草药及以鹿蹄草为主的复配组合对水果褐腐病菌的抑制作用,旨在为研制高效低毒的新型植物源防腐保鲜剂提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌种

褐腐病菌(*Monilinia fructicola*)由北京农学院植物病理实验室提供。

1.1.2 供试中草药

鹿蹄草购自陕西省太白县;虎杖、丁香、厚朴、大黄、五味子、高良姜、购自北京市回龙观大药房。

1.1.3 培养基

马铃薯琼脂(PDA)培养基。

1.2 方法

1.2.1 中草药提取液制备

参照艾启俊^[6]方法制得浓度为100mg/ml的各中草药提取液,冰箱冷藏备用。

1.2.2 菌丝生长抑制率测定

首先参照蒋细良^[7]等方法使褐腐病菌生长同步化,即在28℃,PDA平板上培养菌落约5cm大小,用直径6mm打孔器打取菌落边缘菌块作为接种物,则各接种物间就比较一致。再参照吴新安^[8]等人的方法,分别制成含药10mg/ml的带药培养基,将6mm菌片接入培养皿中央,28℃培养,定期测量菌落直径大小。每个菌落十字交叉测量两次直径,取平均值。纯PDA培养作为CK。

生长抑制率(%)=(CK净生长量-处理净生长量)/CK净生长量×100^[8]

1.2.3 中草药复配的实验设计

以鹿蹄草为主要原料,按照体积比1:1和1:1:1将它与其余六种进行两两和三三组合,共21个配方,分别制成含药10mg/ml的带药培养基,参照1.2.1的方法测复合配方对褐腐病菌菌丝生长抑制率。

1.2.3 增效组合最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)的测定

参照范青生^[9]等方法,增效各组合等倍稀释制得浓度分别为20.0、10.0、5.0、2.5、1.25、0.625、0.3125mg/ml带药培养基,用移液管吸取50μl病原菌孢子悬浮液(浓度10⁶~10⁷个/ml),接种在培养基上相应的位置,纯PDA培养基设为CK,28℃恒温箱中培养24~48h。待CK中有菌丝生长后即可观察结果。以没有菌丝生长的最低药

物浓度作为MIC。每个浓度处理重复3次,整个实验重复2次。

在MIC测定基础上,继续培养至7d,显微镜下观察,病菌孢子完全没有萌发的浓度,即判定该浓度就是抑菌物质对该病原菌的MBC。

1.2.4 增效组合最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)作用下水果褐腐病菌菌丝形态的扫描电镜观察

以11号中草药组合为例,在PDA培养基中添加药液,使带药培养基中药液的最终浓度分别为MIC和MBC浓度,用移液管吸取50μl病原菌孢子悬浮液(浓度10⁶~10⁷个/ml),接种在培养基上相应的位置,纯PDA培养基设为CK,在28℃恒温箱中培养5d,选取菌丝块,用戊二醛固定,经过常规方法处理,日立S-570扫描电镜观察。

2 结果与分析

2.1 单剂中草药对褐腐病菌的抑制作用

表1 10mg/ml不同中草药对褐腐病菌的生长抑制率(第5d)
Table 1 Inhibitory rates of 10mg/ml different Chinese herbs against *Monilinia fructicola*

编号	中草药	菌落直径 (mm)	生长抑制率 (%)	显著性差异	
				0.05	0.01
	CK	69.20	0.00	a	A
	丁香	41.17	44.36	b	B
	高良姜	38.87	48.00	b	B
	虎杖	29.67	62.55	c	C
	五味子	26.10	68.20	c	C D
	鹿蹄草	21.20	75.95	d	D E
	大黄	17.87	81.22	d	E
	厚朴	17.63	81.59	d	E

注:字母相同者表示差异不显著。

从表1看出,7种中草药单剂对水果褐腐病菌表现出较好的抑制作用,并且均显著好于CK,其中4号大黄、5号厚朴、7号鹿蹄草表现最好,抑菌率分别达到81.22%、81.59%、75.95%,与CK相比差异显著,三个处在同一显著水平。1号五味子和3号虎杖之间差异不显著,次于4、5、7号。2号高良姜和6号丁香的抑制作用最小,抑制率分别是48.00%和44.36%。根据抑制率的大小,各中草药单剂对褐腐病菌的抑制强弱为5号>4号>7号>1号>3号>2号>6号。

2.2 鹿蹄草等中草药复配对褐腐病菌的抑制作用

21种复配组合对褐腐病菌的抑制作用差异较大(表2),6、11、14、17、18、21号组合与各组成单剂相比,抑制率均有不同程度的提高,即都有协同增效作用,其中11号组合效果最好,抑制率达到89.77%,其次是14号和21号组合,与其他组合及CK相比,差

异显著。从菌落大小及形态看,11、14、21号组合菌落较小,各菌落生长也比较均匀,菌落上面有菌丝产生,很少有孢子。根据抑制率及菌落的大小,各增效组合对褐腐病菌抑制作用强弱依次为11号>14号>21号>6号>18号>17号。

1、3号组合的生长抑制率均小于其各组成单剂,说明各单剂之间存在拮抗作用;其余各组合的生长抑制率处于其各组成单剂之间,说明它们之间的配伍不会使药效增加。

表2 10mg/ml不同中草药复配对褐腐病菌的生长抑制率(第5d)
Table 2 Inhibitory rates of 10mg/ml different combined Chinese herbs against *Monilinia.fracticola*

编号	中草药组合	菌落直径 (mm)	生长抑制率 (%)	显著性差异	
				0.05	0.01
22	C K	69.20	0.00	a	A
2	+	31.73	59.28	b	B
13	+ +	31.53	59.60	b	B
16	+ +	27.73	65.61	c	B C
12	+ +	27.60	65.82	cd	B C
9	+ +	27.00	66.77	cde	B C D
4	+	26.77	67.14	cde	B C D
3	+	26.37	67.77	cde	C D E
7	+ +	25.67	68.88	cdef	C D E
5	+	24.53	70.68	cdefg	C D E F
15	+ +	23.77	71.89	defgh	C D E F G
19	+ +	23.17	72.84	efghi	C D E F G
1	+	22.27	74.26	fghij	D E F G H
8	+ +	21.50	75.47	ghij	E F G H
20	+ +	20.37	77.27	hijk	F G H I
10	+ +	19.67	78.38	ijkl	F G H I J
17	+ +	18.83	79.69	klm	G H I J
18	+ +	17.67	81.54	klm	H I J
6	+	16.13	83.97	lm	I J K
21	+ +	15.47	85.02	mn	I J K
14	+ +	15.17	85.50	mn	J K
11	+ +	12.47	89.77	n	K

注:字母相同者表示差异不显著。

2.3 增效组合最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)的测定

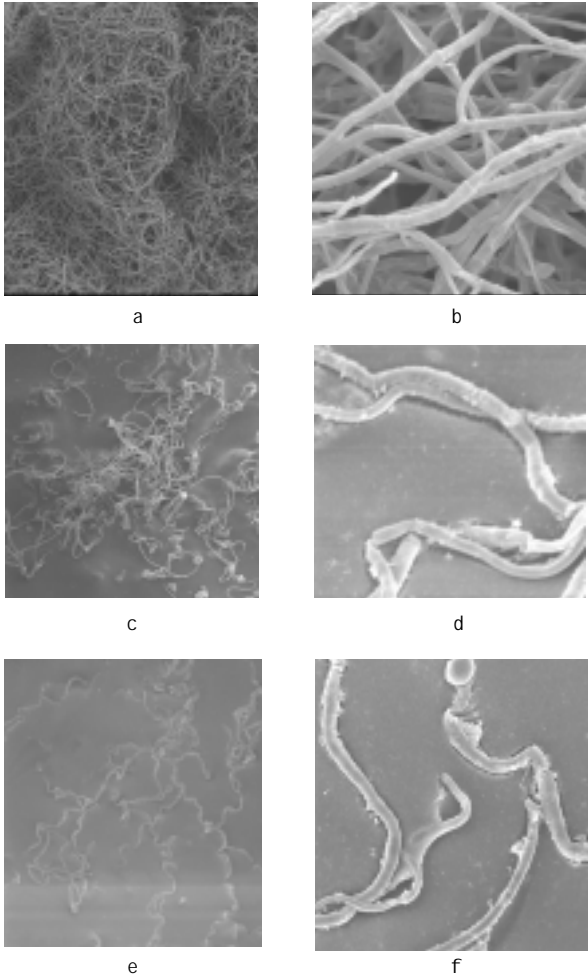
表3 三种中草药复配组合对褐腐病菌的MIC/MBC(浓度单位:mg/ml)
Table 3 MIC and MBC of 3 combined Chinese herbs against *Monilinia.fracticola* (unit: mg/ml)

-	11号中草药组合	14号中草药组合	21号中草药组合
MIC/MBC	1.25/2.5	2.5/5.0	1.25/5.0

由表3可以看出,11、14、21号中草药组合的最小抑菌浓度(MIC)分别是1.25、2.5、1.25mg/ml;11、14、21号组合的最小杀菌浓度(MBC)分别是2.5、5.0、5.0mg/ml。

2.4 增效组合最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)作用下水果褐腐病菌菌丝形态的扫描电镜观察

在中草药浓度不同的培养基上,褐腐病菌的生长状态有明显的差异,如图1,对照菌丝生长旺盛,菌丝密集成网状,且菌丝表面光滑,隔膜清晰(图1a、b);MIC浓度处理下,菌丝数量减少,部分菌丝断裂,菌丝表面出现絮状凝集(图1c、d);MBC浓度处理下,菌丝数量大为减少,大部分出现断裂,菌丝变得透明,且出现部分消融(图1e、f)。



a (×150)、b (×1500)未加中草药时正常菌丝体;c(×150)、d (×1500) MIC浓度时的菌丝体;e(×150)、f (×1500)MBC浓度时的菌丝体。

图1 11号中草药组合对水果褐腐病菌的抑制作用
Fig.1 Antifungal activity of No.11 combined Chinese herb medicine on *Monilinia.fracticola*

3 讨论

据统计,在我国具有抑菌作用的中草药约5000余种,它们的有效成分主要包括多糖、萜醌类、挥发油、生物碱等,不同提取方法其提取液的有效成分不同^[8]。本试验筛选得到的7种中草药的某些有效成分可以分散在水相中,因此采用煎煮的方法提取,更有利

黄酮类化合物抗氧化活性的构效关系

陆 曦, 王 磊, 魏 红, 杨转琴, 王 威*
(天津师范大学化学与生命科学学院, 天津 300074)

摘 要: 分别应用 DPPH 分光光度法和连苯三酚自氧化法比较了 4 种黄酮类化合物及 5 种具有羟基的化合物的抗氧化活性。结果表明, 这些化合物由于分子结构上的相似性而都具有一定的抗氧化活性, 其清除 DPPH 作用大小顺序依次为: 槲皮素 > 连苯三酚 > 芦丁 > 儿茶素 > 邻苯二酚 > 抗坏血酸 > 桑色素 > 间苯二酚 > 苯酚, 并且这种作用随其浓度的增加而增大; 而对连苯三酚自氧化反应的抑制作用强弱顺序依次为: 抗坏血酸 > 邻苯二酚 > 间苯二酚 > 苯酚 > 芦丁 > 儿茶素 > 槲皮素 > 桑色素。结合试验数据从而推断除抗坏血酸以外的 8 种化合物的构效关系为: 邻位羟基清除自由基的活性强于间位羟基; 同样在 B 环上具有邻位羟基的条件下, C 环的 2, 3 位为双键结构时, 清除自由基的作用增强; C 环 3 位上羟基被糖基化时可能减弱其他酚羟基活性。

关键词: 黄酮类化合物; 抗氧化活性; 自由基; 构效关系

Structure-activity Relationship of Flavonoid Antioxidant Activity

LU Xi, WANG Lei, WEI Hong, YANG Zhuan-qin, WANG Wei*
(College of Chemistry and Life Science, Tianjin Normal University, Tianjin 300074, China)

Abstract: A study of the antioxidant activity of four flavonoids and five hydroxyl compounds was carried out by DPPH method and pyrogallol method. The result showed the tested samples all had the antioxidant activity. The orders of the DPPH scavenging ability was quercetin > pyrogallol > rutin > catechin > catechol > ascorbic acid > morin > resorcinol > phenol.

收稿日期: 2006-04-25

*通讯作者

基金项目: 天津市自然科学基金项目(033610911)

作者简介: 陆曦(1979-), 女, 硕士研究生, 主要从事天然黄酮化合物抗氧化活性的研究。

于实践应用。

为了提高中草药的抑菌效果, 扩大抑菌谱, 本实验在 7 种中草药之间进行了复配。复配以我国一种重要的中草药资源—鹿蹄草为主, 按照两两和三三等倍混合进行, 这样存在一定的局限性, 一些其他比例复配效果更好的组合可能会漏选。

应用生长速率法进行室内药效测定与田间试验相比省工省时, 但室内药效测定结果与田间防治效果经常会有一定差别, 所以药剂的使用价值须经多次田间药效试验结果来验证。本试验结果可为进一步的田间试验及生产上褐腐病菌的防治提供参考。

虽然中草药复配药效没有化学药剂那样明显, 但他有着化学药剂不可替代的优点: 对人畜安全, 不杀伤天敌昆虫, 选择性强, 对生态环境影响小, 天然防腐保鲜剂是果品保鲜的必然趋势, 但中草药防腐保鲜剂的研制和开发还有待于进一步深入。

参考文献:

- [1] 张维一, 毕阳. 果蔬采后病害与控制[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996.
- [2] 王英祥, 王革, 曾千春, 等. 果实褐腐病的调查与防治研究[J]. 云南农业大学学报, 1998, (3): 29-32.
- [3] Eckert JW. Postharvest disease of fresh fruits and vegetables[J]. Journal of Food Biochemistry, 1978, (2): 248-254.
- [4] 张华云, 王善广, 高习英, 等. 防腐保鲜剂在桃贮藏中的应用[J]. 保鲜与加工, 2000, (创刊号): 29-30.
- [5] 朱璇. 天然中草药果蔬防腐保鲜剂的研究进展[J]. 新疆农业科学, 2004, 41(专刊): 110-111.
- [6] 艾启俊. 苹果贮藏中鹿蹄草浸提物抗真菌研究初探[J]. 西北园艺, 2003, (12): 9-11.
- [7] 谢德龄, 蒋细良, 倪楚芳, 等. 中生菌素对水稻细菌性条斑病的防治试验[J]. 中国生物防治, 1995, 11(2): 91-92.
- [8] 吴新安. 中草药提取物对几种植物病原菌的抗菌活性研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2002.
- [9] 范青生, 马振亚. 防腐抑菌中药的微量快速筛选法研究及其应用[J]. 微生物学通报, 1991, 18(2): 114-118.