

王东方,王庆忠,谷 鹏,等. 石榴叶提取物的抑菌杀虫活性[J]. 江苏农业科学,2014,42(3):95-96.

石榴叶提取物的抑菌杀虫活性

王东方,王庆忠,谷 鹏,柏显首

(山东省高校生物化学与分子生物学重点实验室/潍坊学院,山东潍坊 261061)

摘要:以 75% 乙醇为溶剂,采用索氏提取法提取石榴(*Punica granatun* L.)叶的有效成分,并对该提取物的抑菌作用进行了测定。结果表明,石榴叶提取物对白色葡萄球菌抑菌活性明显,对黑腹果蝇成虫有明显的毒害作用,且毒性效果与浓度呈正相关。石榴叶提取物对槐蚜防治效果明显,当石榴叶提取物浓度为 60 mg/mL 时,24 h 后槐蚜校正死亡率达 96.72%。石榴叶提取物具有广谱抑菌杀虫活性。

关键词:石榴叶;提取物;生物活性

中图分类号:S482.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)03-0095-02

石榴叶是石榴科植物石榴(*Punica granatun* L.)的叶,具有收敛止泻、解毒杀虫等功效。石榴叶中含有 20 多种化合物,其中鞣质能凝固微生物的原生质及多种酶,因而对各种细菌、真菌有抑制作用^[1]。石榴皮对淋球菌有明显的抑制作用^[2]。关于石榴叶提取物的抑菌杀虫活性目前尚未见报道。笔者采用 75% 乙醇提取石榴叶的有效成分,并对其生物活性进行研究,旨在为开发利用石榴资源提供依据。

收稿日期:2013-07-10

基金项目:山东省星火计划(编号:2012XH06031);山东省潍坊市科技发展计划(编号:2011022,20111023);潍坊学院科技发展计划(编号:2012x07)。

作者简介:王东方(1970—),男,山东潍坊人,硕士,讲师,主要从事微生物生理生化、生物制药研究。Tel:(0536)8785288, E-mail:wangdlf@wfu.edu.cn。

1 材料与方法

1.1 材料

石榴叶与槐蚜采自潍坊学院校园内。大肠杆菌(*Escherichia coli*)、白色葡萄球菌(*Staphylococcus albus*)取自潍坊学院生物与农业工程学院微生物学实验室。

1.2 仪器

仪器:800A 型中药粉碎机(山东省青州市精诚医药装备制造有限公司),re-5299 旋转蒸发仪、SHZ-III A 型循环水真空泵(上海一凯仪器设备有限公司),CJ-1680 型超净工作台等。乙醇(上海凌峰化学试剂有限公司)、二甲基亚砜(DMSO)(国药集团化学试剂有限公司)等。

1.3 方法

1.3.1 石榴叶提取物的制备 清洗并晾干石榴叶,将石榴叶置于烘箱中 65 ℃ 烘干,用中药粉碎机粉碎 15~30 s。称取

[55]刘 薇,徐尔尼,徐颖宣,等. 串珠霉与链霉菌混合发酵产纤维素酶条件的研究[J]. 中国酿造,2008,14(14):26-29.

[56]Ochi K. From microbial differentiation to ribosome engineering[J]. Bioscience Biotechnology Biochemistry,2007,71(6):1373-1386.

[57]Shima J,Hesketh A,Okamoto S,et al. Induction of actinorhodin production by rpsL(encoding ribosomal protein S12) mutations that confer streptomycin resistance in *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. Journal of Bacteriology,1996,178(24):7276-7284.

[58]李晓玲,游中元,徐 俊,等. 红树林来源白浅灰链霉菌中生物碱类次级代谢产物研究及核糖体工程优化[J]. 台湾海峡,2012,31(1):143-149.

[59]张桂敏,周秀芬,邓子新,等. 将透明颤菌血蛋白基因(*ngb*)转移到链霉菌染色体整合载体的构建[J]. 华中农业大学学报,2004,23(6):602-605.

[60]Hotta K,Yamashita F,Okami Y,et al. New antibiotic-producing streptomycetes,selected by antibiotic resistance as a marker. II. Features of a new antibiotic-producing clone obtained after fusion treatment[J]. The Journal of Antibiotics,1985,38(1):64-69.

[61]Zhang Y X,Perry K,Vinci V A,et al. Genome shuffling leads to rapid phenotypic improvement in bacteria[J]. Nature,2002,415(6872):644-646.

[62]廖国建,李金娥,田宇清,等. 增加尼可霉素生物合成基因簇拷贝数对尼可霉素产量的影响[C]//中国遗传学会第八次代表大会暨学术讨论会论文摘要汇编:2004—2008. 重庆:中国遗传学会,2008.

[63]Mazodier P,Petter R,Thompson C. Intergeneric conjugation between *Escherichia coli* and *Streptomyces* species[J]. Journal of Bacteriology,1989,171(6):3583-3585.

[64]Mahajan G B,Balachandran L. Antibacterial agents from actinomycetes;a review[J]. Frontiers in Bioscience,2012,4:240-253.

[65]Benizri E,Baudoin E,Guckert A. Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria[J]. Biocontrol Science and Technology,2001,11(5):557-574.

[66]Bloemberg G V,Lugtenberg B J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria[J]. Current Opinion in Plant Biology,2001,4(4):343-350.

[67]Fukui R,Fukui H,Alvarez A M. Comparisons of single versus multiple bacterial species on biological control of anthurium blight[J]. Phytopathology,1999,89(5):366-373.

[68]Guetsky R,Shtienberg D,Elad Y,et al. Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control[J]. Phytopathology,2001,91(7):621-627.

100 g 粉末置于烧瓶中,加入 75% 乙醇 500 mL,在电磁恒温搅拌器上搅拌煮沸,回流萃取 2 h。将萃取液真空抽滤后用旋转蒸发仪 40 ℃ 浓缩至干并称重,用 10% DMSO 溶液将石榴叶提取物配制成浓度为 60 mg/mL 的溶液备用^[3]。

1.3.2 石榴叶提取物的抑菌活性测定 用无菌生理盐水把菌种稀释成密度为 10⁶ ~ 10⁷ 个/L 的悬液,吸取 0.2 mL 菌悬液均匀涂布于灭菌平板上^[4]。用 10% DMSO 溶液将石榴叶提取物配制成浓度分别为 10、20、30、40、50、60 mg/mL 的溶液。将直径约 0.4 cm 的滤纸圆片置于各浓度溶液中,风干后放到涂有菌液的平板上,37 ℃ 培养 24 h,测定抑菌圈直径大小,直径大于 1.00 cm 表示有抑菌效果^[5]。

1.3.3 石榴叶提取物对果蝇的毒理活性 采用棉球饲喂法研究石榴叶提取物对果蝇的影响^[6]。将黑腹果蝇成虫用乙醚麻醉,果蝇饥饿 5 ~ 6 h 后饲以不同浓度的供试溶液,每指形管中放 1 个 0.2 g 的脱脂棉球,棉球上蘸有约 2.5 mL 的饲养液,将指形管置于 25 ℃、相对湿度为 50% ~ 60%、光照周期为 12 h/d 的培养箱中饲养 4 d,每 12 ~ 13 h 记录 1 次各处理的死亡果蝇数,4 d 后统计各处理的死亡果蝇数^[7]。

1.3.4 石榴叶提取物对槐蚜的杀虫活性 采用室内叶片法测定石榴叶提取物的杀虫活性^[8]。以大小适中的健康无翅成蚜为试虫,将带虫的叶片修剪成约 25 头虫/每片叶,将叶片置于铺有滤纸的培养皿中。用 10% DMSO 溶液梯度稀释石榴叶提取物储存液,并喷洒于各个试验皿中,以 10% DMSO 溶液作为对照,置于温度为 25 ℃、湿度为 80% 的培养箱内培养 24 h 后统计蚜虫死亡率。死亡率及校正死亡率计算方法分别见公式(1)与公式(2)。

死亡率 = $\frac{\text{试虫死亡数}}{\text{试虫总数}} \times 100\%$ (1)

校正死亡率 = $\frac{\text{处理组死亡率} - \text{对照组死亡率}}{1 - \text{对照组死亡率}} \times 100\%$ (2)

2 结果与分析

2.1 石榴叶提取物的抑菌活性

如图 1 所示,石榴叶提取物对白色葡萄球菌抑菌活性明显,最大抑菌圈直径为 1.5 cm;对大肠杆菌抑菌活性相对较小,最大抑菌圈直径为 0.82 cm。

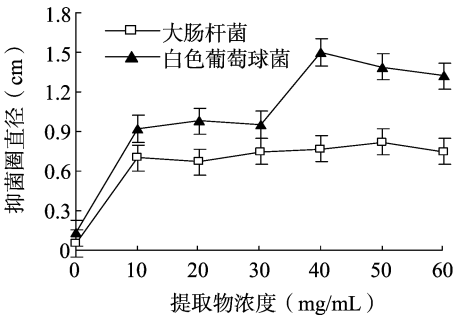


图1 石榴叶提取物对大肠杆菌及白色葡萄球菌的抑菌效果

2.2 石榴叶提取物对果蝇的触杀活性

由图 2 可见,石榴叶提取物对果蝇有很好的触杀作用,石榴叶提取物浓度越高,果蝇死亡数越多,毒力回归方程为 $y = 0.955\ 15x + 10.07$, 相关系数为 $r^2 = 0.963\ 5$, LC_{50} 值为 52.36 mg/mL。

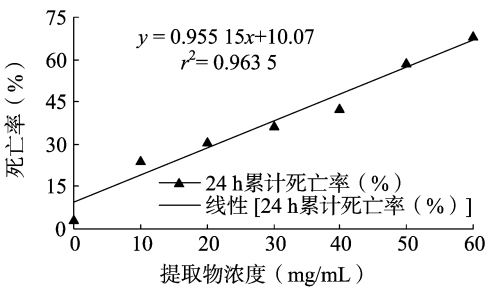


图2 石榴叶提取物对果蝇的触杀活性

2.3 石榴叶提取物对槐蚜的杀虫活性

从表 1 可以看出,石榴叶提取物对槐蚜有很好的触杀作用,当提取物浓度为 40 mg/mL 时,槐蚜校正死亡率达 89.52%;当石榴叶提取物浓度为 60 mg/mL 时,槐蚜校正死亡率达 96.72%。其触杀作用的毒力回归方程为 $y = -21.28x + 120.71$, 相关系数为 $r^2 = 0.864$, LC_{50} 值为 10.42 mg/mL。

表 1 石榴叶提取物对槐蚜的触杀作用

提取液浓度 (mg/mL)	24 h 死亡率 (%)	24 h 校正死亡率 (%)
60	96.84 ± 1.2 *	96.72
50	95.07 ± 1.9 *	94.89
40	86.30 ± 1.2 *	89.52
20	77.40 ± 1.4 *	80.29
10	38.90 ± 2.1 *	40.35
对照	3.60 ± 1.7	

注:“*”表示与对照组差异显著 ($P < 0.05$)。

3 结论与讨论

本研究表明,石榴叶提取物对白色葡萄球菌抑菌活性明显,对黑腹果蝇成虫有明显的毒害作用,且毒性效果与浓度呈正相关。石榴叶提取物对槐蚜防治效果明显,当石榴叶提取物浓度为 60 mg/mL 时,24 h 后槐蚜校正死亡率达 96.72%,与目前使用的化学农药吡虫啉的防治效果差异不显著^[9]。石榴叶提取物具有广谱抑菌杀虫活性。

参考文献:

[1] 周建华,胡建平. 石榴生物活性物质的研究进展[J]. 中国酿造, 2008(14):20-22.

[2] 赵彦超,师宝君,胡兆农. 杠柳毒素 NW 的杀虫活性[J]. 昆虫知识,2008,45(6):950-952.

[3] 张羽飞,于春丽,张春枝. 乙醇室温浸提法提取黄芩总黄酮的工艺条件[J]. 大连轻工业学院学报,2004,23(3):190-193.

[4] 周德庆. 微生物学实验手册[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1986:121-123.

[5] 付良臣,孟昭礼,李玉群. 柳树中农用抑菌活性物的初步研究[J]. 当代生态农业,2005,14(增刊1):113-114.

[6] 王菊凤,李鹤鸣. 蝇虫草多糖对果蝇寿命影响的研究[J]. 中国野生植物资源,2008,27(3):38-41,48.

[7] 杨冬梅,陈玲,龙灿,等. 北冬虫夏草提取液对果蝇繁殖力及寿命的影响[J]. 湖南农业科学,2012(11):87-89.

[8] 刘月,霍清,张盛宇,等. 臭椿叶提取液对蚜虫防治效果的研究[J]. 北方园艺,2009(9):94-95.

[9] 王庆忠,王东方,王汉海,等. 番茄茎叶乙醇水提取物对槐蚜的生物活性研究[J]. 北方园艺,2012(24):147-149.