

魏敬怀,周 燚,余思策,等. 26 种植物甲醇提取物对 3 种植物病原细菌的抑制活性[J]. 江苏农业科学,2016,44(6):233-235.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.06.064

# 26 种植物甲醇提取物对 3 种植物病原细菌的抑制活性

魏敬怀,周 燚,余思策,向兰香,杜晓英

(长江大学农学院,湖北荆州 434025)

**摘要:**以魔芋软腐病菌(*Erwinia carotovora* pv. *carotovora*)、白菜黑腐病菌[*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pam) Dowson]、甜瓜细菌性果斑病菌(*Acidovorax avenae citrulli*)为供试菌,采用琼脂药剂扩散法对 26 种植物进行抑菌活性筛选。结果表明,铜钱细辛、裸芸香和小勾儿茶的甲醇提取物在 20 mg/mL 时对 3 种病原细菌均有抑制活性。其中,裸芸香的抑制活性最好,抑菌圈平均直径分别达 1.712、1.611、1.889 cm;铜钱细辛的抑菌圈平均直径分别为 0.962、0.874、1.011 cm;小勾儿茶的抑菌圈平均直径分别为 0.671、0.753、0.724 cm。裸芸香石油醚层萃取部在 5 mg/mL 时对魔芋软腐病菌的抑菌活性最好,抑菌圈的平均直径达 1.487 cm,是下一步研究的重点。

**关键词:**植物源农药;甲醇提取物;植物病原细菌;抑菌活性

**中图分类号:** S482.2<sup>+</sup>92 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)06-0233-03

作物细菌性病害是世界性常发流行性病害,细菌性病害的危害程度比真菌性病害更加严重和更加难以防治<sup>[1]</sup>。随着蔬菜栽培连作年限的增加,病害发生逐渐加重<sup>[2]</sup>。魔芋软腐病主要是由胡萝卜软腐欧文氏杆菌(*Erwinia bacterium*)和菊欧文氏杆菌(*Erwinia chrysanthemi*)引起的细菌性病害<sup>[3]</sup>,在魔芋生长和贮藏期均可危害。生长期发病严重时可能造成魔芋成片倒苗,发病严重地块一般连作 3 年后魔芋基本无收成<sup>[4]</sup>。白菜黑腐病由野油菜黄单胞杆菌(*Xanthomonas campestris*)引起,是一种世界性十字花科蔬菜重要病害<sup>[5]</sup>,严重影响白菜的产量和冬贮供应<sup>[6]</sup>。甜瓜细菌性果斑病又称细菌性果腐病,其病原菌为嗜酸菌属西瓜种(*Acidovorax citrulli*)<sup>[7]</sup>,是近年由国外传入我国的一种毁灭性病害<sup>[8]</sup>。目前针对以上 3 种病害主要依靠抗病育种和化学药剂防治。抗病育种操作困难且周期较长,化学药剂防治不但污染环境,而且长期大量使用化学药剂易使细菌产生抗性,从而大大降低防治效果。自然界中,植物与病原物长期斗争,此消彼长,结果形成了某些植物独特的抑菌能力。因此研究植物天然物质,寻找结构新颖,作用机理特殊的抑菌活性化合物,是杀菌剂研究与开发的一条重要途径。目前关于植物抑菌成分的研究很多,科研人员发现菊科、唇形科、木兰科、马兜铃科、蓼科、木樨科、百合科、葫芦科、莎草科、豆科、十字花科、樟科等的某些植物中均含有天然杀菌成分<sup>[9-10]</sup>。本研究采集了 26 种植物,分别测定其对 3 种病原菌的抗菌活性,以期筛选到抑菌活性较好的植物,为下一步分离和纯化活性化合物提供材料,同时为进一步开发利用和保护植物资源提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试植物材料

植物材料见表 1,由武汉植物园江明喜研究员鉴定。

### 1.2 供试细菌

魔芋软腐病病原菌(*Erwinia carotovora* pv. *carotovora*)、白菜黑腐病病原菌[*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pam) Dowson]、甜瓜细菌性果斑病病原菌(*Acidovorax avenae citrulli*),以上 3 种病原细菌由长江大学农学院植病课题组提供,周燚教授鉴定。

### 1.3 培养基及其成分

培养基参照并改进袁尚勇的方法<sup>[11]</sup>制得。每 1 L 培养基含牛肉浸膏 3 g、蛋白胨 10 g、蔗糖 10 g、琼脂 12 g,培养基 pH 值调至 7.0。

### 1.4 试验方法

1.4.1 植物甲醇提取物对 3 种植物病原菌的抑菌活性测定方法 植物有效成分的提取参照陈兴龙等的方法<sup>[12]</sup>并加以改进,将采集的植物材料阴干,再置于 50 ℃电热鼓风箱烘干,粉碎,用 5 倍植物材料体积的甲醇分别避光浸提 3、2、1 d,合并浸提液,过滤浓缩得植物粗提物,密封置于 4 ℃冰箱备用。抑菌活性测定采用琼脂药剂扩散法<sup>[13]</sup>。具体操作如下:称取 1 g 植物甲醇提取物,用 5 mL 丙酮溶解,配成浓度为 200 mg/mL 的提取物母液。取 0.5 mL 母液用无菌水定容至 5 mL,配制成浓度为 20 mg/mL 的药液备用。病原菌于斜面培养基上 30 ℃培养 2 d,加入无菌水,刮下菌苔,与无菌水充分混合,用比较仪对照制成含细菌浓度为  $6 \times 10^9 \sim 6 \times 10^{10}$  CFU/L 的细菌悬浮液。取 200  $\mu$ L 细菌悬浮液加入到定量 30 mL 熔融冷却至 50 ℃左右的培养基中,充分摇匀并用 9 cm 培养皿倒平板,用直径 0.5 cm 灭菌打孔器于平板上打孔,并向孔中加入 1 滴琼脂,每皿 3 孔,2 个孔为药剂处理,均加入 50  $\mu$ L 药液,1 个孔为空白对照,加入 50  $\mu$ L 10% 丙酮溶液。重复 3 次。将各处理于 30 ℃恒温生化培养箱中培养,24 h 后观察孔穴周围有无抑菌圈,如有用十字交叉法测量各抑菌圈的直径,去除孔穴直

收稿日期:2016-03-23

基金项目:湖北省自然科学基金(编号:2015CFA107)。

作者简介:魏敬怀(1990—),男,安徽淮南人,硕士研究生,从事新农药开发的研究。E-mail:weijinghuaizmm@163.com。

通信作者:杜晓英,博士,副教授,硕士生导师,从事农药学的教学与研究工作。E-mail:cjdxxy@163.com。

表 1 供试植物采集情况

序号	科名	中文名	拉丁学名	采集部位	采集地点
1	荨麻科	钝叶楼梯草	<i>Elatostema obtusum</i> Wedd.	全株	湖北十堰
2	马兜铃科	铜钱细辛	<i>Asarum debile</i> Franch.	全株	湖北十堰
3	七叶树科	天师栗	<i>Aesculus wilsonii</i> Rehd.	枝叶	湖北十堰
4	毛茛科	类叶升麻	<i>Actaea asiatica</i> Hara	全株	湖北十堰
5	毛茛科	毛叶草芍药	<i>Paeonia obovata</i> Maxim. var. <i>willmottiae</i> (Stapf) Stern	全株	湖北十堰
6	毛茛科	川鄂乌头	<i>Aconitum henryi</i> Pritz.	全株	湖北十堰
7	毛茛科	黑水翠雀花	<i>Delphinium potaninii</i> Huth	全株	湖北十堰
8	百合科	吉祥草	<i>Reineckea carnea</i> (Andr.) Kunth	全株	湖北十堰
9	百合科	油点草	<i>Tricyrtis macropoda</i> Miq.	全株	湖北十堰
10	大戟科	湖北大戟	<i>Euphorbia hylonoma</i> Hand. – Mazz.	全株	湖北十堰
11	兰科	虾脊兰	<i>Calanthe discolor</i> Lindl.	全株	湖北十堰
12	菊科	华蟹甲	<i>Sinacalia tangutica</i> (Maxim.) B. Nord.	全株	湖北十堰
13	小檗科	八角莲	<i>Dysosma versipellis</i> (Hance.) M. Cheng ex Ying	全株	湖北十堰
14	小檗科	木鱼坪淫羊藿	<i>Epimedium franchetii</i> Stearn	全株	湖北十堰
15	蓼科	中华抱茎蓼	<i>Polygonum amplexicaule</i> D. Don var. <i>sinense</i> Forb. et Hemsl. ex Stew	根	湖北十堰
16	金粟兰科	安徽金粟兰	<i>Chloranthus anhuiensis</i> K. F. Wu	全株	湖北十堰
17	鼠李科	小勾儿茶	<i>Berchemiella wilsonii</i> (Schneid.) Nakai	枝叶	湖北兴山
18	亚麻科	石海椒	<i>Reinwardtia trigyna</i> Dum.	全株	湖北兴山
19	无患子科	伞花木	<i>Eurycorymbus cavaleriei</i> (Levl.) Rehd. et Hand. – Mazz.	枝叶	湖北兴山
20	黄杨科	顶花板凳果	<i>Pachysandra terminalis</i> Sieb.	枝叶	湖北兴山
21	紫金牛科	紫金牛	<i>Ardisia japonica</i> (Thunb.) Blume	全株	湖北兴山
22	三白草科	裸蒴	<i>Gymnotheca chinensis</i> Decne.	全株	湖北兴山
23	三白草科	三白草	<i>Saururus chinensis</i> (Lour.) Balli.	全株	湖北兴山
24	安息香科	秤锤树	<i>Sinojackia xylocarpa</i> Hu	枝叶	湖北兴山
25	海金沙科	海金沙	<i>Lygodium japonicum</i> (Thunb.) Sw.	全株	湖北宜昌
26	芸香科	裸芸香	<i>Psilopeganum sinense</i> Hemsl.	全株	湖北宜昌

径 0.5 cm,取其平均值。

1.4.2 裸芸香萃取物对魔芋软腐病原菌的抑制活性测定  
采取液-液萃取法。分别用石油醚、氯仿、乙酸乙酯与裸芸香提取物的水溶物进行等量液-液萃取,每萃取重复 3 次,合并浓缩各萃取层得到各层萃取部,密封后置于 4 ℃ 冰箱保存备用。萃取部抗菌活性测定方法同“1.4.1”节,植物萃取物药液浓度为 5 mg/mL。

2 结果与分析

2.1 26 种植物甲醇提取物对 3 种病原细菌的抑菌活性初筛  
采取琼脂药剂扩散法测定 26 种植物甲醇提取物对 3 种病原细菌的抑制活性,结果见表 2。由表 2 可知,在供试的 26 种植物中,铜钱细辛、小勾儿茶和裸芸香的甲醇提取物在浓度为 20 mg/mL 时对 3 种植物病原细菌均有抑制活性。其中裸芸香甲醇提取物对魔芋软腐病菌、白菜黑腐病菌和甜瓜细菌性果斑病菌的抑菌圈直径最大,抑菌圈平均直径分别为 1.712、1.611、1.889 cm;铜钱细辛甲醇提取物对魔芋软腐病菌、白菜黑腐病菌和甜瓜细菌性果斑病菌的抑菌圈直径次之,抑菌圈平均直径分别为 0.962、0.874、1.011 cm;小勾儿茶甲醇提取物对魔芋软腐病菌、白菜黑腐病菌和甜瓜细菌性果斑病菌的抑菌圈直径最小,抑菌圈平均直径仅分别为 0.671、0.753、0.724 cm。其余供试的 23 种植物甲醇提取物在浓度为 20 mg/mL 时对 3 种植物病原细菌的平均抑菌圈直径均为 0,均无抑菌活性。

2.2 裸芸香甲醇提取物各萃取部对魔芋软腐病菌的抑菌活性  
采取琼脂药剂扩散法测定裸芸香甲醇提取物的各溶剂萃

表 2 26 种植物甲醇提取物对 3 种病原细菌的抑制效果

植物材料	魔芋软腐病菌		白菜黑腐病菌		甜瓜果斑病菌	
	抑菌活性	抑菌圈直径 (cm)	抑菌活性	抑菌圈直径 (cm)	抑菌活性	抑菌圈直径 (cm)
钝叶楼梯草	-	0	-	0	-	0
铜钱细辛	+	0.962	+	0.874	+	1.011
天师栗	-	0	-	0	-	0
类叶升麻	-	0	-	0	-	0
毛叶草芍药	-	0	-	0	-	0
川鄂乌头	-	0	-	0	-	0
黑水翠雀花	-	0	-	0	-	0
吉祥草	-	0	-	0	-	0
油点草	-	0	-	0	-	0
湖北大戟	-	0	-	0	-	0
虾脊兰	-	0	-	0	-	0
华蟹甲	-	0	-	0	-	0
八角莲	-	0	-	0	-	0
木鱼坪淫羊藿	-	0	-	0	-	0
中华抱茎蓼	-	0	-	0	-	0
安徽金粟兰	-	0	-	0	-	0
小勾儿茶	+	0.681	+	0.753	+	0.724
石海椒	-	0	-	0	-	0
伞花木	-	0	-	0	-	0
顶花板凳果	-	0	-	0	-	0
紫金牛	-	0	-	0	-	0
裸蒴	-	0	-	0	-	0
三白草	-	0	-	0	-	0
秤锤树	-	0	-	0	-	0
海金沙	-	0	-	0	-	0
裸芸香	+	1.712	+	1.611	+	1.889

注:“+”表示有抑制活性,“-”表示无抑制活性。

取部对 3 种病原细菌的抑制活性,结果见表 3。由表 3 可知,

裸芸香甲醇提取物的各有机溶剂萃取部在浓度为 5 mg/mL 时对魔芋软腐病菌均有抑制作用,其中石油醚萃取部抑菌圈的平均直径最大,达 1.487 cm;乙酸乙酯萃取部的抑菌圈平均直径最小,仅为 1.159 cm。裸芸香甲醇提取物水部浓缩物浓度为 5 mg/mL 时对魔芋软腐病菌抑菌圈直径为 0,无抑菌效果。

表 3 裸芸香甲醇提取物各萃取部对魔芋软腐病菌的抑制效果

植物病原细菌	裸芸香各萃取部(5 mg/mL)的 平均抑菌圈直径(cm)			
	石油醚相	氯仿相	乙酸乙酯相	水相
魔芋软腐病病原菌	1.159	1.487	0	1.253

### 3 讨论

本研究测定的 26 种植物甲醇提取物中,大部分对供试的 3 种病原细菌无抑制活性,相同的植物提取物对不同的病原细菌的抑制活性也有差别。在对供试 3 种病原细菌均有抑制活性的 3 种植物中,在浓度为 20 mg/mL 时,裸芸香甲醇提取物的抑菌活性最好,铜钱细辛次之,小勾儿茶最差。由于不同病原菌对相同物质的敏感度并不相同,对供试病原菌无活性的这 23 种植物也可能对其他病原细菌或真菌有抑制活性,本研究并未涉及,所以可以进一步研究这些植物对其他病原菌的抑制活性,以便发现更多的杀菌植物,以丰富植物性杀菌剂的研究内容,为植物性杀菌剂的研究与开发提供理论依据。采取液-液萃取法跟踪分离裸芸香甲醇提取物对魔芋软腐病病原菌的抑菌活性发现,在浓度为 5 mg/mL 裸芸香甲醇提取物的石油醚层萃取部对魔芋软腐病病原菌的抑制活性最好,可采取色谱技术对裸芸香甲醇提取物的石油醚层萃取部进一步分离,以期分离出具有抑菌活性的单体,为新农药的研究与

开发提供结构新颖的先导化合物。

### 参考文献:

- [1] 胡重怡,蔡刘体. 噬菌体治疗作物细菌性病害的研究进展[J]. 贵州农业科学,2011,39(3):101-103.
- [2] 李宝聚. 我国蔬菜病害研究现状与展望[J]. 中国蔬菜,2006(1):1-5.
- [3] 吴金平. 魔芋软腐病病原菌及其拮抗菌的研究[D]. 武汉:武汉大学,2010.
- [4] 鲁红学,周 焱,赵明敏,等. 不同药剂对魔芋软腐病的防治效果[J]. 现代农业科技,2007(4):44-45.
- [5] Williams P H. Black rot: a continuing threat to world crucifers[J]. Plant Disease,1980,64(8):736-742.
- [6] 李省印. 西安地区大白菜主要病害发生原因调查[J]. 北方园艺,1989(9):29-32.
- [7] 阎莎莎,王铁霖,赵廷昌. 瓜类细菌性果斑病研究进展[J]. 植物检疫,2011,25(3):71-76.
- [8] 王 雪,高 洁,张 静,等. 63 种杀菌剂对西瓜、甜瓜细菌性果斑病菌的室内毒力测定[J]. 吉林农业大学学报,2012,34(6):612-617,623.
- [9] 王发松,杨得波,任三香,等. 香叶树果挥发油的化学成分和抗菌活性研究[J]. 天然产物研究与开发,2000,11(6):14.
- [10] 于文喜,康迎昆,靳春波,等. 暴马丁香心材提取物中有效抗菌成分的研究[J]. 林业科技,1996,21(6):23-25.
- [11] 袁尚勇. 魔芋软腐菌生物学特性测定及软腐病防治方法研究[D]. 武汉:华中农业大学,2007.
- [12] 陈兴龙,潘汝谦,盖云鹏,等. 31 种植物甲醇提取物对荔枝霜疫霉菌和炭疽病菌的抑菌活性测定[J]. 广东农业科学,2012,39(3):1-3.
- [13] 周立刚. 植物抗菌化合物[M]. 北京:中国农业科学技术出版社,2005:74-83.
- [14] 王 斌. 腐殖酸对棉田土壤磷素有效性影响研究[D]. 乌鲁木齐:新疆农业大学,2007.
- [15] 秦国新,朱靖蓉,马兴旺,等. 改性腐殖酸对土壤磷素的激活效应[J]. 新疆农业科学,2008,45(6):1048-1051.
- [16] 李 丽,朱 琨,张 兴. 腐殖物质钝化和活化土壤重金属的防污染作用[J]. 腐植酸,2008(3):9-13,27.
- [17] 杨志福. 腐殖酸类物质在农业生产中应用的概况及前景[J]. 腐植酸,1988(2):4-9,3.
- [18] 李志洪,王淑华,高 强,等. Zn 和 ABT 对玉米根系生长及根际磷酸酶活性和 pH 的影响[J]. 植物营养与肥料学报,2004,10(2):156-160.
- [19] 吴林坤,林向民,林文雄. 根系分泌物介导下植物-土壤-微生物互作关系研究进展与展望[J]. 植物生态学报,2014,38(3):298-310.
- [20] 胡琼英,兰叶青,薛家骅. 土壤胶体稳定性影响因素[J]. 土壤,1996(6):290-294,315.
- [21] 王洪凤,吴钦泉,谷端银,等. 风化煤腐殖酸对土壤理化性状的影响[J]. 腐植酸,2014(6):8-12,36.
- [22] 张宏伟,陈志泉,宁 平,等. 腐殖酸共聚物土壤改良剂对土壤化学性能的影响[J]. 水土保持通报,2003,23(6):36-38.

(上接第 176 页)

- [3] 黄元炯,张 毅,张 翔,等. 腐殖酸和饼肥对土壤微生物和烤烟产质量的影响[J]. 中国烟草学报,2008,14(增刊1):25-28.
- [4] 谢明文. 不同浓度腐殖酸对烟草幼苗壮苗机理的探讨[J]. 耕作与栽培,2002(2):23-24,30.
- [5] 靳志丽,刘国顺,梁文旭. 腐殖酸对烤烟根系生长和生理活性的影响[J]. 烟草科技,2002(7):36-38.
- [6] 李 欣,于恒秀,杨成根,等. 生根粉及植物激素在粳稻杂交花药培养中的应用研究[J]. 江苏农业研究,2001,22(2):1-6.
- [7] 贾 娟,姚延寿,史敏华,等. 生根剂促进槭树植物扦插繁殖的研究进展[J]. 西北林学院学报,2010,25(4):107-109,134.
- [8] 高立明,江芳荣,李忠娴,等. ABT 生根粉在棉花上的应用试验总结[J]. 江西农业科技,1997(3):38-40.
- [9] 王建丽,申忠宝,钟 鹏,等. 不同浓度三种药剂浸种对玉米种子萌发及幼苗生长的影响[J]. 杂粮作物,2009,29(4):276-278.
- [10] 陶世蓉,韩广清,王福青. ABT 生根粉对花生根系活力及叶片光合性能的影响[J]. 中国油料作物学报,2000,22(2):45.
- [11] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京:中国农业出版社,2000.
- [12] 李 丽,武丽萍,成绍鑫. 腐殖酸钾与速效磷肥结合形态对磷的有效性影响[J]. 土壤肥料,2000(3):7-9.
- [13] Weier K L, MacRae C I, Myers R J K. Denitrification in a clay soil under pasture and annual crop: estimation of potential loss using in-