

苟亚峰,胡林峰,陈世敏,等.硬枝黄蝉提取物对胡椒瘟病病菌的抑菌活性及抑菌活性成分分离[J].江苏农业科学,2019,47(24):67-69.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.24.017

硬枝黄蝉提取物对胡椒瘟病病菌的抑菌活性及抑菌活性成分分离

苟亚峰¹, 胡林峰², 陈世敏², 杨贺贺², 孙世伟¹

(1. 中国热带农业科学院香料饮料研究所,海南万宁 571533; 2. 河南科技学院,河南新乡 453003)

摘要:胡椒瘟病是威胁胡椒产业发展的首要病害,由于长期使用化学农药,易造成病害产生抗药性,并影响胡椒品质。因此,拟从植物源杀菌剂研发的角度对硬枝黄蝉的抑菌活性进行研究。以胡椒瘟病病菌为供试病原菌,采用活性跟踪法对硬枝黄蝉乙醇提取物石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯萃取组分的抑菌活性进行研究。结果显示,硬枝黄蝉乙醇提取物三氯甲烷萃取组分、乙酸乙酯萃取组分对胡椒瘟病病菌的抑菌活性较高,抑菌率分别达到了 83.40%、96.92%。对乙酸乙酯萃取组分进行进一步分离,得到 AN-01~AN-10 等 10 个馏分,其中 AN-02、AN-03、AN-04 对胡椒瘟病病菌的抑菌活性较高,抑菌率分别达到 100.00%、100.00%、81.45%。由结果可知,硬枝黄蝉乙醇提取物乙酸乙酯萃取组分中对胡椒瘟病病菌的抑菌活性主要集中在 AN-02、AN-03、AN-04 这 3 种馏分上,下一步将继续对这 3 种馏分抑菌活性物质进行分离,为研制新型植物源杀菌剂奠定基础。

关键词:硬枝黄蝉提取物;胡椒瘟病菌;抑菌活性;馏分

中图分类号: S435.73 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)24-0067-03

硬枝黄蝉 (*Allemanda nerifolia* Hook.) 是夹竹桃科 (Apocynaceae) 黄蝉属 (*Allemanda*) 植物,为常绿灌木植物,原产于巴西,在我国亚热带地区的广东、福建、广西、台湾等地有引种,现广泛栽培于热带地区,是一种观赏植物^[1]。夹竹桃科植物一般有毒,含有多种类型的生物碱,如夹竹桃苷、萝芙木碱、长春花碱、软枝黄蝉苷等,是重要的药物原料,可治疗多种疾病,在农业上用于杀虫防治。林同等研究发现,硬枝黄蝉花的乙醇提取物对白蚁具有一定的防治效果^[2];冯岗等研究发现,软枝黄蝉提取物对螺旋粉虱成虫、椰心叶甲具有一定的毒杀活性^[3-4],但关于其抑菌活性的报道较少。笔者前期对丰富的热带植物抑菌活性进行筛选发现,硬枝黄蝉具有较强的抑菌活性,但对具体的抑菌活性成分未进行分离。因此,本试验以威胁胡椒产业发展的主要病害胡椒瘟病病菌为供试病原菌,研究硬枝黄蝉无水乙醇提取物的萃取组分及其馏分的抑菌活性,以期为进一步分离硬枝黄蝉的抑菌活性物质提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试病原菌 胡椒瘟病病菌 (*Phytophthora capsici*) 由中国热带农业科学院香料饮料研究所提供,桑利伟等对海南

省主产区胡椒瘟病病原进行鉴定,结果显示,胡椒瘟病由辣椒疫霉 (*Phytophthora capsici*) 引起^[5]。

1.1.2 供试植物 供试植物硬枝黄蝉全株采自中国热带农业科学院香料饮料研究所内及万宁市文通村内。

1.2 硬枝黄蝉无水乙醇提取物的制备

供试植物硬枝黄蝉样品前处理和提取均参照冯俊涛等的方法^[6],得到无水乙醇提取物浸膏后,于冰箱中 (0~4℃) 保存备用。

1.3 硬枝黄蝉提取物不同萃取物的制备

采用液-液萃取法,具体参照笔者之前报道的操作方法^[7]进行,分别得硬枝黄蝉乙醇提取物石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯萃取组分浸膏,备用。

1.4 抑菌活性测定方法

采用菌丝生长速率法^[8-9]。具体方法如下:称取 0.2 g 硬枝黄蝉无水乙醇提取物浸膏,用无菌蒸馏水定容至 20 mL,制成浓度为 10 mg/mL 的无水乙醇提取物母液。再用无菌蒸馏水稀释制成浓度为 5 mg/mL 的无水乙醇提取物。然后将培养基融化并冷却至 50℃ 左右,将 4 mL 不同浓度的硬枝黄蝉无水乙醇提取物分别与 36 mL/瓶的 PDA (马铃薯葡萄糖琼脂) 培养基混合,摇匀后迅速将其倒入 3 个直径为 9 cm 的培养皿中。待其凝固后,取菌落直径为 6 mm、培养好的各供试病原菌的外层菌块置于培养皿中央,以加入等体积灭菌水的 PDA 培养平板为对照,每个处理设 3 皿重复。接种后,在人工气候培养箱 (温度为 25~28℃) 中培养 5 d 后,采用交叉法分别测量菌落直径 (cm),求其平均值,按下式计算菌落直径和抑菌率:

菌落直径 = 测量菌落直径平均值 - 0.6 cm;

抑菌率 = (对照菌落直径 - 处理菌落直径) / 对照菌落直径 × 100%。

收稿日期:2019-06-17

基金项目:海南省自然科学基金 (编号:318MS097)。

作者简介:苟亚峰 (1980—),女,陕西宝鸡人,硕士,助理研究员,主要从事植物源农药研究开发。Tel: (0898) 62556083; E-mail: gouyf2007@163.com。

通信作者:孙世伟,硕士,副研究员,主要从事热带作物病虫害防治工作。Tel: (0898) 62552070; E-mail: sunshw@126.com。

1.5 数据统计分析

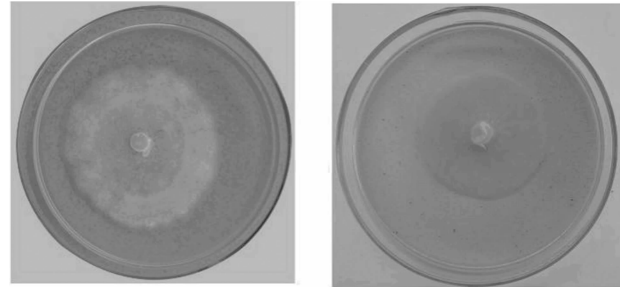
采用 SPSS 数据分析软件进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 硬枝黄蝉乙醇提取物浸膏的提取率

准确称取 10 kg 硬枝黄蝉干粉,采用冷浸提的方法,将滤液减压浓缩得到 770.54 g 硬枝黄蝉乙醇提取物浸膏,提取率为 7.71%。

2.2 硬枝黄蝉乙醇提取物不同极性段萃取组分抑菌活性的

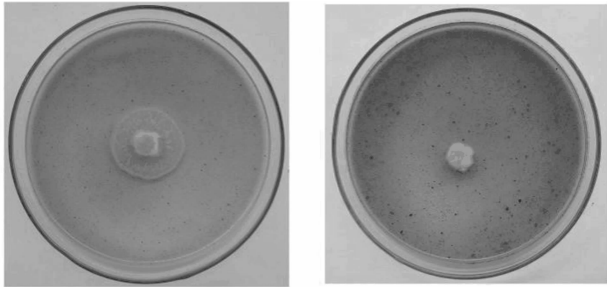


a. CK

b. 石油醚萃取组分

测定

分别采用石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯对硬枝黄蝉乙醇提取物浸膏进行萃取,分别得到石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯萃取组分,采用“1.4”节的方法进行抑菌活性的测定。从图 1、表 1 可以看出,三氯甲烷、乙酸乙酯萃取组分对胡椒瘟病菌具有较好的抑菌活性,抑菌率分别达到 83.40%、96.92%,石油醚萃取组分的抑菌活性较低。因此,下一步将以乙酸乙酯萃取组分为高活性萃取组分,进一步采用硅胶柱层析对其抑菌活性成分进行分离。



c. 三氯甲烷萃取组分

d. 乙酸乙酯萃取组分

图1 硬枝黄蝉乙醇提取物不同萃取组分对胡椒瘟病菌菌丝生长的抑制效果

表 1 硬枝黄蝉乙醇提取物不同萃取组分的抑菌率

样品	抑菌率(%)			
	重复 1	重复 2	重复 3	平均
石油醚萃取组分	66.67	41.86	45.61	51.38a
三氯甲烷萃取组分	86.67	83.72	79.82	83.40b
乙酸乙酯萃取组分	92.50	100.00	98.25	96.92c

注:采用 SPSS 数据分析法,在 0.05 水平测定差异显著性,同列数据后标有不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。表 2 同。

2.3 柱层析溶剂洗脱系统的筛选

采用硅胶柱层析对乙酸乙酯萃取组分进行分离时,首先要筛选合适的溶剂洗脱系统。本试验通过薄层色板,以 R_f 值在 0.1~0.2 范围内的溶剂系统为首选洗脱系统,对常用有机溶剂石油醚、正己烷、乙酸乙酯、乙醇等单一溶剂或混合溶剂进行展板比较,最终选择石油醚-乙酸乙酯溶剂系统作为硅胶柱层析的洗脱剂。

2.4 抑菌活性成分的分离

在“2.3”节的基础上,采用的硅胶柱层析以石油醚-乙酸乙酯为溶剂洗脱系统,对硬枝黄蝉乙醇提取物乙酸乙酯萃取组分中的活性成分进行梯度洗脱。设置石油醚、乙酸乙酯体积比=20:1、18:1、15:1、12:1、10:1、8:1、5:1、2:1、1:1、1:2、1:5、1:8、1:10、1:12、1:15、1:18、1:20 的洗脱梯度。最后用甲醇清柱,每瓶馏分收集 200 mL,一共收集 229 瓶。

采用 TLC 展板合并相同的馏分,得到 AN-01、AN-02、AN-03、AN-04、AN-05、AN-06、AN-07、AN-08、AN-09、AN-10 等 10 种馏分。

2.5 不同馏分抑菌活性的测定

采用“1.4”节的方法对 AN-01、AN-02、AN-03、AN-04、AN-05、AN-06、AN-07、AN-08、AN-09、AN-10 等 10 种馏分的抑菌活性进行测定。

从表 2 可以看出,馏分 AN-02、AN-03 和 AN-04 对胡

椒瘟病菌具有一定的抑菌活性,抑菌率分别达到 100.00%、100.00%、81.45%。初步确定硬枝黄蝉乙醇提取物对胡椒瘟病菌的抑菌活性成分集中在这 3 个馏分中,具体是哪一种化合物有待进一步分离。

表 2 不同馏分的抑菌活性测定结果

馏分	抑菌率(%)			
	重复 1	重复 2	重复 3	平均
AN-01	—	—	—	—
AN-02	100.00	100.00	100.00	100.00a
AN-03	100.00	100.00	100.00	100.00a
AN-04	80.19	84.91	79.25	81.45b
AN-05	6.60	10.38	11.32	9.43d
AN-06	16.04	45.28	10.38	23.90c
AN-07	6.60	8.49	7.55	7.55d
AN-08	1.89	5.66	0.94	2.83d
AN-09	6.60	7.55	0.94	5.03d
AN-10	1.89	2.83	3.15	2.62d

注:“—”代表样品量太少,无法测定抑菌率。

3 讨论

本研究发现,硬枝黄蝉乙醇提取物采用石油醚、三氯甲烷和乙酸乙酯 3 种溶剂萃取后,三氯甲烷、乙酸乙酯萃取组分对胡椒瘟病菌的抑菌活性较高,其抑菌率分别达到了 83.40%、96.92%,石油醚萃取组分的抑菌率仅为 51.38%。进一步对抑菌活性较高的乙酸乙酯萃取组分进行减压柱层析分离,并采用薄层色板进行展板合并,得到 AN-01~AN-10 等 10 个馏分。对分离的 10 个馏分进行抑菌活性测定,结果显示,其中 AN-02、AN-03、AN-04 对胡椒瘟病菌表现出较高的抑菌活性,抑菌率分别达到了 100.00%、100.00%、81.45%。下一步将结合馏分质量和抑菌活性强度对馏分 AN-02、AN-03、AN-04 中的抑菌活性进行进一步分离,从而为开发研制新型植物源杀菌剂奠定基础。

目前,已经开始被应用于生产防治植物病害的植物源杀菌剂有大蒜素、苦参碱、根复特、混合脂肪酸、银杏提取素、低聚糖素、植物激活蛋白、丁子香酚、黄连素、柠檬醛·烯和丙烯醛·香芹酚等^[10]。石志琦等报道,蛇床子素具有杀虫抑菌的双重作用;2006 年石志琦联合江苏省苏科农化有限责任公司开发了首个蛇床子素杀菌剂 1% 蛇床子素水乳剂,用于替代三唑类、代森锰锌等杀菌剂,可以减少化学农药使用量达 30%~60%,有效保障了农产品的安全^[11]。张晓艳等研究发现,江苏省农业科学院产地环境与投入品安全研究室研发的 20% 丁香酚水乳剂对番茄黄化曲叶病毒具有较高的防效^[12]。沈阳化工研究院在 1997 年以天然抗生素为先导化合物研制了 1 种新型甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂烯炔菌酯,其对瓜类、番茄具有明显的促进生长和提高品质的作用,用于防治霜疫霉病、苹果叶斑病和小麦赤霉病等^[13-14]。李嘉报道,黄蝉属植物主要的化学成分为环烯醚萜、木脂素等,其中环烯醚萜内酯成分黄蝉花定、鸡蛋花素等具有抗肿瘤和抗真菌的生物活性^[15]。Tiwari 等研究发现,从软质黄蝉中分离出的鸡蛋花苷显示出强烈的抗皮肤真菌的活性^[16]。因此,在本研究的基础上,对硬枝黄蝉中的抑菌活性物质有待进一步分离。

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 第六十三卷 [M]. 北京: 科学出版社, 1977: 73-78.
- [2] 林同, 陆宁将, 樊绪富, 等. 黄蝉和驳骨丹对橄榄星室木虱的毒杀活性[J]. 中国森林病虫, 2006, 25(5): 41-42.
- [3] 冯岗, 闫超, 张静. 软枝黄蝉提取物对螺旋粉虱的杀虫活性[J]. 热带农业科学, 2013, 33(7): 54-57.

(上接第 66 页)

参考文献:

- [1] 冯东昕, 李宝栋. 主要瓜类作物抗白粉病育种研究进展[J]. 中国蔬菜, 1996(1): 55-59.
- [2] 范瑛阁, 龚明福, 朱丽霞. 黄瓜白粉病菌生防菌筛选及生防机制初步研究[J]. 北方园艺, 2010(14): 150-153.
- [3] 张雪辉. 室内黄瓜白粉病防治方法研究[J]. 河北师范大学学报(自然科学版), 2005, 29(2): 190-192.
- [4] 周益林, 段霞瑜, 盛宝钦. 植物白粉病的化学防治进展[J]. 农药学报, 2001, 3(2): 12-18.
- [5] 丁建丽, 塔西甫拉提·特依拜, 熊黑钢, 等. 塔里木盆地南缘绿洲土地覆盖变化[J]. 地理学报, 2002, 57(1): 19-27.
- [6] Romero D, De Vicente A, Zerrouh H, et al. Evaluation of biological control agents for managing cucurbit powdery mildew on greenhouse-grown melon[J]. Olant Pathology, 2007, 56(6): 976-986.
- [7] 唐丽娟, 纪兆林, 徐敬友, 等. 地衣芽孢杆菌 W10 对灰葡萄孢的抑制作用及其抗菌物质[J]. 中国生物防治, 2005, 21(3): 203-205.
- [8] 林福呈, 李德葆. 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) S9 对植物病原真菌的溶菌作用[J]. 植物病理学报, 2003, 33(2): 174-177.
- [9] Ongena M, Jacques P. *Bacillus lipopeptides*: versatile weapons for plant disease biocontrol[J]. Trends in Microbiology, 2008, 16(3): 115-125.
- [10] Yu G Y, Sinclair J B, Hartman G L, et al. Production of iturin A by

- [4] 张静, 冯岗. 软枝黄蝉提取物对椰心叶甲的杀虫活性[J]. 热带作物学报, 2010, 31(7): 1152-1156.
 - [5] 桑利伟, 刘爱勤, 谭乐和, 等. 海南省胡椒瘟病病原鉴定及发生规律[J]. 植物保护, 2011, 37(6): 168-171.
 - [6] 冯俊涛, 石勇强, 张兴. 56 种植物抑菌活性筛选试验[J]. 西北农林科技大学(自然科学版), 2001, 29(2): 65-68.
 - [7] 苟亚峰, 孙世伟, 高圣风, 等. 圆滑番荔枝叶乙醇提取物不同萃取组分对胡椒瘟病菌的抑菌活性测定[J]. 热带农业科学, 2014, 34(4): 60-62.
 - [8] 方中达. 植物研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 140-142.
 - [9] 慕立义. 植物化学保护研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1994: 79-81.
 - [10] 敖礼林, 况小平. 植物源杀菌剂简介[J]. 农业知识(致富与农资), 2013(8): 51-53.
 - [11] 石志琦, 陈浩. 新型植物源创制农药蛇床子素[J]. 世界农药, 2010, 32(6): 52-54.
 - [12] 张晓艳, 陈浩, 张晓阳, 等. 植物源抗病毒剂丁香酚防治番茄黄化曲叶病毒的效果分析[J]. 江西农业学报, 2013, 25(10): 54-56.
 - [13] 李江华, 冯俊涛, 孙文文, 等. 天名精内酯酮酯类衍生物的合成及其对黄瓜炭疽病菌的抑菌活性[J]. 西北农业学报, 2009, 18(2): 283-286.
 - [14] Feng J T, Wang H, Ren S X, et al. Synthesis and antifungal activities of carabrol ester derivatives[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(15): 3817-3823.
 - [15] 李嘉. 黄蝉属植物化学成分研究进展[J]. 中国新药杂志, 2006, 15(16): 1341-1344.
 - [16] Tiwari T N, Pandey V B, Dubey N K. Plumieride from *Allamanda cathartica* as an antidermatophytic agent[J]. Phytotherapy Research, 2002, 16(4): 393-394.
-
- [1] *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani* [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2002, 34(4): 955-963.
 - [11] Reva O N, Dixielu C, Meijer J, et al. Taxonomic characterization and plant colonizing abilities of some bacteria related to *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis* [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 48(2): 249-259.
 - [12] 樊继强. 生防芽孢杆菌的筛选及其抗菌物质的分离纯化与鉴定[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2016: 14.
 - [13] 杨巍民, 杨星, 沈宙, 等. 生防菌株 AI-05 对黄瓜白粉病的防治及菌株鉴定[J]. 农药, 2016, 55(4): 304-306.
 - [14] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
 - [15] Watanabe K, Kodama Y, Harayama S. Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting [J]. Journal of Microbiological Methods, 2001, 44(3): 253-262.
 - [16] Kavkova M, Curn V. *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) as a potential mycoparasite on *Sphaerotheca fuliginea* (Ascomycotina: Erysiphales) [J]. Mycopathologia, 2005, 159(1): 53-63.
 - [17] 杨文香, 张汀, 刘大群. 三株链霉菌对黄瓜白粉病及黄瓜生长的影响[J]. 河北农业大学学报, 2005, 28(4): 80-83, 92.
 - [18] 王春梅, 吴桂本, 王英姿, 等. 蛇床子素防治黄瓜白粉病研究[J]. 江苏农业科学, 2005(4): 57-58.