

细辛对番茄早疫病菌的抑制作用及其活性成分的分离

李少华

(太原大学 外语师范学院,太原 030001)

摘要 以番茄早疫病菌为供试植物病原菌,采用生物活性追踪法和活体盆栽试验法评价了细辛提取物的抑菌活性,并探索了细辛的杀菌活性成分。结果表明:细辛氯仿粗提取物在 96 和 48 h 对供试菌的菌丝生长和孢子萌发都有较强的抑制作用。其中对菌丝生长和孢子萌发的半效应浓度 EC_{50} 分别为 1.69 和 0.41 mg/mL。细辛氯仿粗提取物经萃取分离得到的石油醚、氯仿和甲醇组分中,石油醚组分对供试菌孢子萌发具有强抑制作用,处理 48 h 后抑制率达到 100%;但处理 96 h 后对菌丝生长的抑制率仅有 40%。氯仿组分对供试菌的菌丝生长和孢子萌发均具有较好的抑制作用,分别为 72.27% 和 83.42%。对氯仿组分进行硅胶柱层析分离,得到 4 个高活性流分,在 96 h 对供试菌菌丝生长的抑制率达到 85% 以上。在盆栽试验中,4 mg/mL 细辛氯仿提取物对番茄早疫病的保护和治疗作用达 70% 以上,与化学农药处理无显著差异。试验显示细辛对番茄早疫病菌具有较好的防治效果。

关键词 细辛; 番茄早疫病菌; 抑菌活性; 活性成分

中图分类号 S 641.2

文章编号 1007-4333(2011)03-0067-05

文献标志码 A

Antifungal activities and active compounds of the extracts from *Asarum himalaicum* against *Alternaria solani*

LI Shao-hua

(Foreign Language and Pedagogic College, Taiyuan University, Taiyuan 030001, China)

Abstract The purpose is to explore the fungicide properties of *Asarum himalaicum* with active chemicals in its extract as a fungicide. The disc diffusion assay was used to test the antifungal activity of the extract of *A. himalaicum* against *Alternaria solani* and the pot experiments was used to evaluate the activities of extract. The result indicated that the crude chloroform extract of *A. himalaicum* had strong antifungal activity and on mycelium growth and spores germination when treated in 48 and 96 h. The EC_{50} of mycelium growth and spores germination of *Alternaria solani* were 1.69 and 0.41 mg/mL respectively. The bioassay result showed that petroleum ether fraction had strong antifungal activity on inhibiting the spores germination which was 100% in 48 h but had weak inhibition ability on mycelium growth which was about 40% in 96 h. The chloroform fraction had strong inhibiting activities both on the mycelium growth and spores germination which were 72.27% (in 96 h) and 83.42% (in 48 h), respectively. The bioassay result showed that four sub-fractions had strong antifungal activities and the inhibition rates on mycelium growth were all higher than 85% in 96 h. The results of pot tests showed that the crude extract exhibited a protective efficacy and therapeutic efficacy over than 70% against the *Alternaria solani* with the extract concentration at 4 mg/mL. *A. himalaicum* could be a potential pesticide against *Alternaria solani*.

Key words *Asarum himalaicum*; *Alternaria solani*; antifungal activity; active component

收稿日期: 2010-10-10

基金项目: 山西省青年科学基金资助项目(2006021033); 山西农业大学引进人才项目(412564)

第一作者: 李少华, 副教授, 硕士, 主要从事生物资源与环境研究, E-mail: tylishaohua2248815@163.com

番茄早疫病(*Alternaria solani*)是危害番茄的重要病害之一,在我国各地普遍发生^[1]。近年来,由于一些地区由推广抗病毒病而不抗早疫病的番茄品种,导致早疫病的发生日趋严重。该病除直接危害茎、叶和果外,还可抑制番茄生长和果实形成,露地和保护地受害都较重,常年减产20%~30%,严重时可达50%以上,甚至绝产。对其防治主要以化学手段为主,但随着化学农药的长期使用、有害生物抗药性的产生、残留毒性以及环境污染等问题已日趋引起人们的重视^[2]。在有机番茄的生产中,除铜制剂还被使用外,大量化学农药已被禁止。因此开发低毒、低残留和无污染及与环境和谐的新型农药已迫在眉睫^[3]。

植物是生物活性化合物的天然宝库,被认为是替代化学合成杀菌剂最好的资源。多种植物中的萜烯类、生物碱类、黄酮类、酚类及有机酸类等都具有较强的抑菌活性^[4]。细辛(*Asarum himalaicum*)为马兜铃科(*Asistolochiaceae*)草本植物,是我国特有的传统中药。近年来,国内外相继报道了细辛提取物对黄曲霉(*Aspergillus* sp.)、黑曲霉(*Aspergillus* sp.)、白色念珠菌(*Candida* sp.)和伤寒杆菌(*Salmonella* sp.)有抑菌作用;对黑斑病菌(*Alternaria panax*)、疫病菌(*Phytophthora cactorum*)等植物病原真菌均有较好的抗菌效果^[6-11]。

本研究以番茄早疫病菌为供试植物病原真菌,通过生物活性追踪法对细辛提取物中的抑菌有效成分进行了初步分离,同时测定了细辛提取物在番茄活体上的保护和治疗作用,旨在为进一步开发新型植物源杀菌剂提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 样品的采集与前处理

试验所用细辛采自山西省历山自然保护区,将采集的植物材料洗净后在室内阴干(约25℃),放入恒温箱内(40~45℃)烘干,磨碎,过60目筛备用。

1.1.2 供试菌种

番茄早疫病菌,由山西农业大学农学院植物病理实验室提供。

1.1.3 供试番茄及化学药剂

番茄:选用感病品种‘上海909’,由陕西省渭南市华山种苗有限公司提供。化学药剂:50%代森锰锌WP,由河北双吉化工有限公司生产。

1.1.4 仪器设备与试剂

RE-52C旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);可裁剪型硅胶板(GF254,天津市天河医疗仪器有限公司);薄层层析展开缸(上海信谊仪器厂);便携式荧光灯(北京市鼎国生物技术发展中心);层析柱(上海禾汽玻璃仪器有限公司)。石油醚、氯仿和甲醇等均为分析纯;柱层析用硅胶(200目)。

1.2 试验方法

1.2.1 细辛粗提取物的制备

准确取3份细辛根粉50g,分别装入500mL小烧杯内,加入干粉5倍量的有机溶剂甲醇、氯仿和石油醚。室温下(30±2)℃浸泡3~5d后,过滤并浓缩至稠膏状,称取一定量的提取物,加2~3滴乳化剂,并依次配成试验所需的浓度,4℃下保存。

1.2.2 细辛氯仿粗提取物的萃取分离

室内生物活性测定结果表明,细辛氯仿粗提取物抑菌活性最强,因此对其进行进一步分离纯化。称取细辛氯仿提取物5g,用10倍量的氯仿溶解,装入分液漏斗中,依次用石油醚、氯仿和甲醇3种溶剂各萃取3次,分别合并萃取液,减压浓缩至稠膏状,称重。配制一定浓度萃取物溶液进行生物活性物质追踪测定。

1.2.3 萃取流分的柱层析分离

称取需分离萃取物40倍的硅胶(200目),与适量的初始洗脱液混匀,迅速注入层析柱中。同时,选取的萃取物8g用少量初始洗脱液使之充分溶解后上柱,通过调节洗脱液各组分的配比,逐步增大极性洗脱,所得各流分经薄层层析(TLC)后,置于荧光检测灯(254nm,356nm)下检测,将相同成分者合并,收集到的各流分减压浓缩后,进行生物活性测定,确定活性成分所在部位。

1.2.4 细辛提取物对番茄早疫病菌菌丝生长的抑制作用

采用生长速率法。用打孔器取6mm菌落边缘生长旺盛的菌种,放在加药的PDA平板上培养,以培养基内加等量无菌水作对照,每次重复3次,置25℃下培养。用十字交叉法测每个菌落的直径,以其平均值代表菌落的直径,以下式求出抑制菌丝生长率:

$$\text{抑制菌丝生长率}/\% = (\text{对照菌落直径} - \text{处理菌落直径}) / (\text{对照菌落直径} - 0.6) \times 100$$

1.2.5 细辛提取物对孢子萌发的抑制作用

取预先配置好的孢子悬浮液10μL,接种到直

径为 9 cm 加药的 PDA 平板上培养,用涂布器涂抹均匀,在 25 ℃ 培养箱中培养 48 h,观察记录孢子萌发数量。每处理设 5 个重复,取平均值。计算孢子萌发率和抑制率。

$$\text{孢子萌发率}/\% = \frac{\text{已萌发孢子数}}{\text{镜检孢子总数}} \times 100$$

$$\text{抑制率}/\% = \frac{(\text{对照萌发率} - \text{处理萌发率})}{\text{对照萌发率}} \times 100$$

1.2.6 细辛提取物对番茄早疫病的保护和治疗效果

采用盆栽试验法。1)在温室盆栽番茄植株上喷施浓度为 4、2 和 1 mg/mL 细辛提取液,24 h 后喷雾接种番茄早疫病菌孢子悬浮液(5 000 个/mL),以 50%代森锰锌 WP 处理作为化学药剂对照,清水处理作为空白对照。2)喷雾接种番茄早疫病菌孢子悬浮液(5 000 个/mL),24 h 后喷施质量浓度为 4、2 和 1 mg/mL 的细辛提取物。每处理 4 次重复,每个重复 2~3 株番茄。4~6 d 后调查病情,计算不同处理的病情指数和相对防效。

2 结果与分析

2.1 细辛粗提取物对番茄早疫病菌菌丝生长和孢子萌发的抑制作用

从石油醚、氯仿和甲醇提取物对番茄早疫病菌的抑菌活性中可以看出(表 1,表 2),3 种细辛提取物在 48 h 对孢子萌发和 96 h 对菌丝生长都有不同程度的抑制作用。其中,细辛石油醚提取物在浓度为 2 mg/mL 在对菌丝的抑制作用中,细辛氯仿提取物的抑制率达到 60.00%;甲醇提取物和石油醚提取物的抑制率分别为 51.58%和 24.21%。在浓度为 1 mg/mL 时对番茄早疫病菌孢子萌发抑制率达到 91.94%;细辛氯仿提取物和甲醇提取物分别为 88.71%和 54.30%。由于氯仿对孢子萌发和菌丝生长都有很好的抑制作用,通过对其进行了回归分析,96 h 氯仿提取物对菌丝的 EC₅₀ 为 1.69 mg/mL;48 h 对孢子萌发的 EC₅₀ 为 0.41 mg/mL(表 3)。

表 1 细辛氯仿提取物对番茄早疫病菌菌丝生长和孢子萌发的抑制

Table 1 Inhibition effects of different concentration of *A. himalaicum* extracts on mycelium growth and spores germination of *Alternaria solani*

质量浓度/(mg/mL)	菌丝生长 ^①		孢子萌发 ^②		
	菌落直径/cm	抑制率/%	质量浓度/(mg/mL)	平均萌发率/%	抑制率/%
CK	5.72±0.02 a	—	CK	93.00±2.08 a	—
2.00	2.93±0.21 d	54.42	2.00	2.50±1.89 e	97.13
1.00	3.43±0.10 c	44.66	1.00	12.00±0.82 d	87.10
0.50	5.20±0.15 b	10.16	0.50	35.00±2.08 c	62.37
0.25	5.30±0.10 b	8.20	0.25	79.50±1.71 b	14.52

注:不同字母表示 $\alpha=0.05$ 差异显著。①菌丝生长 96 h;②孢子萌发 48 h。下同。

表 2 2 mg/mL 细辛粗提取物对生长 96 h 时番茄早疫病菌的抑制作用

Table 2 Antifungal activities of the various extracts from *A. himalaicum* against *Alternaria solani* with 2 mg/mL

处理	菌落直径/cm	生长抑制率/%
CK	5.35±0.03 a	—
甲醇	4.20±0.12 b	51.58
氯仿	2.90±0 c	60.00
石油醚	2.50±0.05 d	24.21

表 3 细辛粗提取物对番茄早疫病菌菌丝生长和孢子萌发的毒力

Table 3 Lethal dosage of the crude extract against mycelium growth and spore germination of *Alternaria solani*

处理	抑制中浓度/(mg/mL)	回归方程	相关系数
菌丝生长	1.69	$Y=4.5889+1.8041X$	0.9691
孢子萌发	0.41	$Y=6.0568+2.7242X$	0.9767

2.2 细辛氯仿粗提取物不同萃取组分对番茄早疫病菌菌丝生长和孢子萌发的抑制作用

用石油醚,氯仿和甲醇对细辛氯仿提取物进行

了萃取分离,分别得到石油醚、氯仿和甲醇 3 个萃取组分。不同萃取组分抑菌活性的生物测定结果表明(表 4),在 48 h 时,浓度为 1 mg/mL 石油醚组对番

茄早疫病菌孢子萌发抑制率达到 100%，氯仿组为 83.42%，甲醇组为 63.10%。96 h 时，2 mg/mL 浓度的氯仿组对番茄早疫病菌的菌丝生长抑制率达 72.27%，而相同浓度下的石油醚组和甲醇组对番茄

早疫病菌的菌丝抑制率为 40.50% 和 32.71%。细辛氯仿组萃取物对番茄早疫病菌菌丝在 96 h 时的 EC_{50} 为 0.81 mg/mL；细辛氯仿萃取物对番茄早疫病菌孢子在 48 h EC_{50} 为 0.24 mg/mL (表 5)。

表 4 细辛粗提取不同萃取物对番茄早疫病菌的抑制

Table 4 Inhibition effects of different concentration of liquid-liquid extraction fractions of the extract against *Alternaria solani*

菌丝生长 ^①			孢子萌发 ^②		
质量浓度/(mg/mL)	菌落平均直径/cm	抑制率/%	质量浓度/(mg/mL)	平均萌发率/%	抑制率/%
CK	5.23±0.07 a	—	CK	93.50±3.40 a	—
4.00	1.03±0.02 e	90.64	1.00	15.50±1.89 d	83.42
2.00	1.78±0.03 d	74.44	0.50	21.00±3.32 d	77.54
1.00	2.88±0.06 c	50.68	0.25	42.50±2.22 c	54.55
0.50	3.92±0.06 b	28.37	0.13	71.75±3.01 b	23.26
0.25	4.03±0.12 b	25.85	0.06	78.25±0.85 b	16.31

注：①菌丝生长 96 h；②孢子萌发 48 h。

表 5 细辛氯仿萃取组分对番茄早疫病菌菌丝生长和孢子萌发的毒力

Table 5 Lethal dosage of the chloroform fraction against mycelia growth and spore germination of *Alternaria solani*

处理	抑制中浓度/(mg/mL)	回归方程	相关系数
菌丝生长	0.81	$Y=5.1546+1.7150X$	0.9759
孢子萌发	0.24	$Y=6.1045+1.7913X$	0.9809

2.3 细辛氯仿萃取组分不同柱层析流分对番茄早疫病菌菌丝生长和孢子萌发的抑制作用

将细辛氯仿萃取组分通过硅胶柱层析分离，得到 10 个流分，分别测定了 10 个流分对番茄早疫病菌菌丝的抑菌活性，结果表明 (表 6)，不同流分的抑菌活性差异较大，其中第二流分 (L2)、第三流分 (L3)、第四流分 (L4) 和第五流分 (L5) 对番茄早疫病菌的抑制作用明显优于其他流分。在 1 mg/mL 的浓度下，L2 对番茄早疫病菌的菌丝在 96 h 时抑制

表 6 细辛氯仿萃取物柱层析流分对番茄早疫病菌的抑制作用

Table 6 Antifungal activities of column chromatogram sub-fractions of the extract against *Alternaria solani*

柱层析流分	菌落平均直径/cm	抑制率/%	柱层析流分	菌落平均直径/cm	抑制率/%
CK	6.32±0.03 a	—	L6	3.78±0.13 d	44.35
L1	4.77±0.18 b	27.16	L7	3.63±0.27 d	46.97
L2	0.00±0.00 f	100	L8	3.73±0.11 d	45.22
L3	0.00±0.00 f	100	L9	3.83±0.07 d	43.47
L4	1.12±0.03 e	90.97	L10	4.36±0.05 c	34.27
L5	1.37±0.09 e	86.60			

注：菌丝生长 96 h 测定。

率为 100%，L3 为 100%，L4 达到 90.97%，L5 为 86.60%。

2.4 盆栽试验和不同浓度的细辛氯仿粗提取物对番茄早疫病的保护及治疗作用

在盆栽保护作用测试中，细辛氯仿提取物对

番茄早疫病的防治效果显著，同时防治效果与浓度成正相关 (表 7)。质量浓度 4 mg/mL 时，防治效果达 73.27%，2 mg/mL 时防治效果为 56.06%，1 mg/mL 达到 41.29%。而在治疗作用测试中，也表现出了较好的防治作用，4 mg/mL 浓

度防治效果为 72.30%, 2 mg/mL 浓度防治效果达到 69.26%, 1 mg/mL 时为 42.77%, 这一结果

表明, 细辛氯仿提取物对番茄早疫病在 4 mg/mL 浓度时具有显著的预防和治疗作用。

表 7 盆栽试验不同浓度的细辛粗提取物对番茄早疫病的保护及治疗作用

Table 7 Protective and therapeutic effects of the crude extract of *A. himalaicum* against *Alternaria solan* on potted plants

处 理	保护作用		治疗作用	
	病情指数	对照病情指数/%	病情指数	对照病情指数/%
CK	88.33±3.00 a		88.33±3.00 a	
50%代森锰锌	26.90±1.56 d	74.62	26.90±1.56 d	74.62
4 mg/mL	28.33±4.41 d	73.27	30.33±1.67 d	72.30
2 mg/mL	46.57±2.02 c	56.06	54.30±1.00 c	69.26
1 mg/mL	62.23±2.94 b	41.29	75.56±2.94 b	42.77

3 结论与讨论

植物源杀菌剂是利用植物里含有的某些抗菌物质或诱导产生的植物防卫素, 杀死或有效抑制某些病原菌的生长发育。植物体内的抗菌化合物是植物体产生的多种具有抗菌活性的次生代谢产物, 包含了生物碱类、类黄酮类、蛋白质类、有机酸类和酚类化合物等。

从本试验结果可以看出, 细辛对植物病原菌菌丝生长和孢子萌发均有不同的抑菌活性。以石油醚和氯仿提取物萃取组分的抑菌效果较好; 通过对氯仿萃取物进行柱层析分离, 流分 L2、L3、L4 和 L5 抑菌活性明显高于其他流分, 对番茄早疫病菌丝生长的抑制作用都在 85% 以上。在盆栽试验中, 细辛氯仿提取物对番茄早疫病的保护和治疗作用在 4 mg/mL 时防治效果达到 70% 以上, 与化学药剂处理无显著差异。

曾虹燕等用不同方法提取辽细辛挥发油, 通过 GC-MS 分析鉴定出了 48 种成分, 主要成分为甲基丁香酚(Methyl eugenol)、黄樟醚(Satrole)、艾草醚(Estragole) 和 3, 5-二甲氧基甲苯(3, 5-Dimethoxytoluene)^[12]。刘海燕等用细辛挥发油对 16 种植物病原真菌进行了抑菌活性测定, 其中对 14 种病原菌的抑制率在 50% 以上, 说明细辛挥发油对植物病原真菌的抑制活性^[13]。而在本试验中, 通过对流分 L2、L3、L4 和 L5 进行薄层层析分析, 发现其中可能有 3 个流分抑菌活性最高。如 L2、L3 为挥发油, 且极性较低, 但具体抑菌活性成分仍需进一步的分离、鉴定。

细辛广泛分布于我国各地, 资源丰富, 其良好的抑菌活性对于新型安全、高效的植物性杀菌剂的开发具有十分广阔的前景。

参 考 文 献

- [1] 肖娱玉, 曲一凡, 张琪, 等. 番茄早疫病病菌生物学特性研究[J]. 江苏农业科学, 2010(3): 144-146
- [2] 张中一, 施正香, 周清. 农用化学品对生态环境和人类健康的影响及其对策[J]. 中国农业大学学报, 2003, 8(2): 73-77
- [3] Rong Tsao. Starting from nature to make better insecticides [J]. Chemtech, 1995, 25(7): 23-27
- [4] 王树桐, 王晓燕, 刘均玲, 等. 对马铃薯晚疫病病菌有杀菌毒性的中草药的筛选[J]. 河北农业大学学报, 2001, 24(2): 101-107
- [5] 张亚玉, 王英平, 赵兰坡. 北细辛的研究现状[J]. 特产研究, 2004(4): 50-52
- [6] 王肖娟, 马志卿, 谢惠琴, 等. 细辛醚对 20 种植物病原真菌的抑菌活性[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2007, 35(11): 111-114
- [7] 李蕊倩. 细辛提取物对镰刀菌抑菌作用的初步分析[J]. 山西农业大学学报: 自然科学版, 2009, 29(1): 59-61
- [8] 谢伟, 陆满文. 细辛挥发油的化学与药理作用[J]. 宁夏医学杂志, 1995(2): 121-123
- [9] 黄顺旺. 细辛的药理毒理和临床应用[J]. 安徽医药, 2003, 7(6): 477-479
- [10] 张国珍, 樊瑛, 丁万隆, 等. 麻黄和细辛挥发油的抗真菌作用[J]. 植物保护学报, 1995, 22(4): 373-374
- [11] 王树桐, 胡同乐, 王晓燕, 等. 对番茄灰霉病菌有抗菌活性的植物提取物的室内筛选[J]. 河北农业大学学报, 2003, 26(1): 61-64
- [12] 曾虹燕, 金永钟, 包罗涛, 等. 不同方法提取的辽细辛挥发油指纹图谱分析[J]. 测试技术学报, 2004, 18(3): 232-236
- [13] 刘海燕, 高微微, 樊瑛, 等. 细辛挥发油抗植物病原真菌活性初步研究[J]. 植物病理学报, 2007, 37(1): 95-98