

牛心朴子提取物抑菌效果研究

郭成瑾¹, 沈瑞清¹, 杨晋², 张丽荣¹

(1. 宁夏农林科学院 植物保护研究所, 宁夏植物病虫害防治重点实验室, 宁夏 银川 750002;

2. 北方民族大学 化学与化学工程学院, 宁夏 银川 750021)

摘要:采用菌丝生长速率法测定了3种牛心朴子提取物对番茄早疫病菌和番茄灰霉病菌的抑制作用。结果表明,当供试浓度为500 mg/L时,牛心朴子总生物碱、牛心朴子甾体皂苷和牛心朴子总黄酮对番茄病原菌菌丝生长均有一定的抑制作用,其中牛心朴子总生物碱的抑菌活性最高,抑制率可达85%以上。牛心朴子总生物碱对番茄早疫病菌和番茄灰霉病菌的 EC_{50} 分别为84.3471 mg/L和135.8679 mg/L。牛心朴子总生物碱可作为植物源杀菌剂进一步研究开发。

关键词:牛心朴子;抑菌活性;番茄早疫病菌;番茄灰霉病菌

中图分类号:S 482.2⁺92 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2012)06-0175-03

牛心朴子(*Cynanchum komarovii* Al. Iljinski.) 属萝藦科(Asclepiadaceae)鹅绒藤属植物,又名老瓜头,广泛分布于宁夏、内蒙古以及陕西等地荒漠地区^[1-3]。有研究发现^[4-6],牛心朴子主要化学成分除含有生物碱外,还有黄酮醇类、糖类、脂肪酸和甾醇类等成分。张曦燕等^[6]牛心朴子总生物碱对稻瘟病和灰霉病菌的抑制作用,张维库等^[7]对牛心朴子生物活性的初步研究表明,牛心朴子生物碱对多种植物病害病原菌生长具有抑制作用,但未见牛心朴子其它化学成分对植物病原菌抑菌活性及毒力测定的报道。因此,现采用3种牛心朴子化学成分提取物对温室番茄常见病害病原菌进行室内抑菌试验,旨在筛选出抑菌活性较高的提取物及对番茄病原菌的抑制中浓度,为牛心朴子生物农药研究开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试试剂:牛心朴子总生物碱、牛心朴子甾体皂苷、牛心朴子总黄酮由北方民族大学化工学院提供。3种供试样品各取25 mg,用1 mL 甲醇溶解,配制成 2.5×10^4 mg/L母液,4℃冰箱内保存备用。供试菌种:番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea* Pers.),番茄早疫病菌(*Alternaria solani* (E. et M.) Jones et Grouet.)由宁夏农林科学院植物

保护研究所植物病理室提供。待试验前,将供试菌种转接于PDA培养基上进行活化处理,备用。

1.2 试验方法

1.2.1 牛心朴子提取物抑菌活性筛选 加热融化定量PDA培养基50 mL,在无菌条件下,冷却至50~55℃时加入1 mL供试药剂母液,稀释至500 mg/L,充分摇匀后,迅速倒入无菌培养皿中,制成加药培养基。凝固后,将事先培养好的供试菌种用0.5 cm打孔器打成菌饼,用接种针或小镊子接入平板内,菌丝面朝下贴于培养基表面中央,3次重复。以加1 mL 甲醇的培养基为空白对照。倒置于25℃恒温培养箱内培养,定期观察,72 h后用十字交叉法测定供试菌菌落生长直径,利用下述公式计算菌丝生长抑制率:菌落直径(cm)=测量菌落直径平均值-0.5;抑菌率(%)=(对照组菌落直径-处理组菌落直径)/处理组菌落直径 $\times 100\%$ 。

1.2.2 牛心朴子提取物对病原菌毒力测定 利用筛选出的抑菌效果明显的样品母液(2.5×10^4 mg/L),用PDA培养基稀释成25、50、100、200、400 mg/L 5个浓度梯度,采用1.2.1的测试方法进行毒力测定,72 h后记录试验结果,用DPS软件进行数据处理与分析。

1.3 项目测定

抑菌活性测定采用抑制菌丝生长速率法^[8]。

2 结果与分析

2.1 牛心朴子提取物抑菌活性筛选结果

由表1可知,3种牛心朴子提取物稀释浓度为500 mg/L时,对番茄灰霉病菌和番茄早疫病菌菌丝生长均有一定的抑制作用。其中,牛心朴子总生物碱对2种番茄病害菌丝生长表现出较强的抑制作用,对番茄灰霉病菌菌丝生长抑制率在72 h为92.81%,在96 h为

第一作者简介:郭成瑾(1978-),女,陕西宝鸡人,硕士,助理研究员,研究方向为植物病理学。

责任作者:沈瑞清(1964-),男,甘肃武威人,博士,研究员,现主要从事植物病理学和真菌学等研究工作。

基金项目:国家民委化工技术重点实验室资助项目(2007SY015)。

收稿日期:2011-12-19

86.76%。对番茄早疫病菌丝生长抑制率在 72 h 为 97.12%，在 96 h 为 94.34%。牛心朴子甾体皂苷对番茄早疫病菌丝生长抑制率在 72 h 为 59.01%，96 h 为 61.89%，对番茄灰霉病菌菌丝生长抑制率在 72 h 和 96 h 均为 50% 以下。而牛心朴子总黄酮对 2 种番茄病害菌丝生长抑制率在 72 h 和 96 h 均小于 30%，抑菌活

性较低。方差分析表明，牛心朴子总生物碱与其它 2 种供试样品在抑菌活性上相比较，差异达极显著水平，牛心朴子甾体皂苷次之。由此可知，牛心朴子总生物碱对抑制番茄灰霉病菌和番茄早疫病菌丝生长抑制作用强，抑制率高。

表 1 牛心朴子提取物对 2 种番茄病菌菌丝生长抑制效果

供试样品	番茄灰霉病				番茄早疫病			
	72 h		96 h		72 h		96 h	
	菌落平均直径 /cm	菌丝生长抑制率 /%	菌落平均直径 /cm	菌丝生长抑制率 /%	菌落平均直径 /cm	菌丝生长抑制率 /%	菌落平均直径 /cm	菌丝生长抑制率 /%
牛心朴子总生物碱	0.37	92.81±0.75aA	0.99	86.76±0.77aA	0.09	97.12±0.61aA	0.26	94.34±1.42aA
牛心朴子总黄酮	3.66	28.34±3.71cC	5.56	26.09±2.59cC	2.44	23.80±1.03cC	3.31	27.37±1.87cC
牛心朴子甾体皂苷	2.73	46.73±3.03bB	4.35	42.17±2.33bB	1.31	59.01±1.61bB	1.74	61.89±1.57bB
CK	5.11	—	7.54	—	3.20	—	4.56	—

注：根据新复极差显著性分析检验。相同小写字母表示 5% 水平差异不显著，相同大写字母表示 1% 水平差异不显著。

2.2 牛心朴子提取物对番茄病害病原菌毒力影响

由表 2 可知，牛心朴子总生物碱对番茄病害病原菌抑菌效果好，因此将牛心朴子总生物碱母液 (2.5×10^4 mg/L) 稀释成 25、50、100、200、400 mg/L 5 个浓度梯度进行毒力测定。结果表明，牛心朴子总生物碱对番茄早疫病菌的 EC_{50} 为 84.3471 mg/L，而对番茄灰霉病菌的 EC_{50} 为 135.8679 mg/L。由此可知，牛心朴子总生物碱对番茄早疫病菌的抑菌活性好于番茄灰霉病菌。

表 2 牛心朴子总生物碱对 2 种番茄病害病原菌的毒力测定

供试菌种	毒力回归方程($Y=a+bX$)	相关系数 R	$EC_{50}/mg \cdot L^{-1}$
番茄灰霉病	$Y=-0.0266+2.3565X$	0.9964	135.8679
番茄早疫病	$Y=0.9029+2.1272X$	0.9958	84.3471

3 结论与讨论

该研究结果表明，牛心朴子总生物碱、牛心朴子甾体皂苷、牛心朴子总黄酮对番茄灰霉病菌和番茄早疫病菌菌丝生长均有一定的抑制作用。其中，牛心朴子总生物碱 (500 mg/L) 对番茄病害病原菌有较强的抑菌活性，抑制率可达 85% 以上。毒力试验表明，牛心朴子总生物碱对番茄早疫病菌的 EC_{50} 为 84.3471 mg/L，对番茄灰霉病菌的 EC_{50} 为 135.8679 mg/L。

毒力测定表明，牛心朴子总生物碱对多种农作物病原菌都有很好的抑菌效果。这与前人研究结果基本相同^[5-6]。但前期研究并未涉及牛心朴子其它化学成分的

抑菌活性。该试验不仅研究了牛心朴子总生物碱、牛心朴子甾体皂苷和牛心朴子总黄酮 3 种提取物的抑菌活性，并进一步对牛心朴子总生物碱对病原菌抑制中浓度进行了测定。

牛心朴子可作为植物源农药进一步研究开发。试验表明，牛心朴子提取物具有较强的抑菌活性，但研究仍处于活性成分的初步筛选等方面。因此，对牛心朴子提取物抑菌活性作用机理，分离提纯高抑菌活性物质，仍需进一步研究和探讨。

参考文献

- [1] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴[M]. 3 册. 北京: 科学出版社, 1996: 481.
- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1997(8): 240.
- [3] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编[M]. 下册. 北京: 人民卫生出版社, 1983: 151.
- [4] 方圣鼎, 张瑞, 陈女燕, 等. 老瓜头中的化学成分[J]. 植物学报, 1989, 31(12): 934-938.
- [5] 张瑞, 方圣鼎, 陈女燕, 等. 老瓜头中的化学成分(续)[J]. 植物学报, 1991, 33(11): 870-875.
- [6] 张曦燕, 米海莉, 曹有龙, 等. 牛心朴子总生物碱对稻瘟病和灰霉病菌的抑制作用[J]. 中国农学通报, 2006(1): 262-264.
- [7] 张维库, 白红进, 田小卫, 等. 牛心朴子生物活性的初步研究[J]. 农药, 2004, 43(5): 214-216.
- [8] 孙广宇, 宗兆锋. 植物病理学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.

Study on Antifungal Action of *Cynanchum komarovii* Extracts

GUO Cheng-jin¹, SHEN Rui-qing¹, YANG Jin², ZHANG Li-rong¹

(1. Institute of Plant Protection, Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Ningxia Key Laboratory of Plant Disease and Pest Control, Yinchuan, Ningxia 750002; 2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Beifang University of Nationalities, Yinchuan, Ningxia 750021)

膜荚黄芪子叶节植株再生体系的建立

王树斌, 全雪丽, 周玉红, 吴松权

(延边大学 农学院, 吉林 延吉 133002)

摘要:以膜荚黄芪无菌苗子叶节为外植体,建立了简单、高效和稳定的膜荚黄芪再生体系。结果表明:不定芽诱导的最适培养基是 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.10 mg/L,每个子叶节外植体平均出芽数为 3 个以上,再生频率达 75.5%;生根最适培养基为 1/2MS+IBA 0.5 mg/L;移栽后成活率达 75%以上。

关键词:膜荚黄芪;子叶节;再生体系

中图分类号:S 567.5⁺3 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2012)06-0177-02

黄芪来源豆科植物膜荚黄芪(*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge)或蒙古黄芪(*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge var. *mongholicus* (Bunge) Hsiao)的干燥根,为补气之常用中药,具有补气固表、利尿排脓、敛疮生肌的功效^[1]。随着对黄芪药理作用研究的不断深入和黄芪保健品的开发,对其需求量也越来越大。目前野生黄芪种质资源几近枯竭,难以满足人们保健的需要^[2]。组织培养是种质资源保存和扩大栽培的有效途径,近年来出现了一些对黄芪植株再生的报道,不过其再生频率较低,最高的仅为 32%,植株再生芽的数量少,难以满足遗传转化的需求^[3]。无菌苗子叶节具有取材不受季节限制、再生频率高等优点^[4]。该试验首次以膜荚黄芪子叶节为外植体,研究通过子叶节直接分化出芽,旨在建立一种快速有效的再生体系,为膜荚黄芪的种质资源保存和遗传转化奠定基础。

第一作者简介:王树斌(1986-),男,山东烟台人,硕士,现主要从事园艺植物生物技术研究工作。

责任作者:吴松权(1972-),男,吉林龙井人,博士,副教授,现主要从事植物基因工程研究工作。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30860036);吉林省自然科学基金资助项目(201115228)。

收稿日期:2012-01-10

1 材料与方法

1.1 试验材料

膜荚黄芪种子由延边大学长白山动植物资源研究中心保存。基本培养基为 MS 培养基,添加不同浓度和组合的植物生长调节剂。培养基中添加 3%的蔗糖和 0.8%的琼脂,调节 pH 至 5.8。组培室温度(25±2)℃,相对湿度 70%,光照强度 1 800 lx,每天光照 16 h。

1.2 试验方法

1.2.1 种子消毒 用 70%的酒精表面消毒 30 s,用无菌水冲洗 1 次,加入 2%次氯酸钠消毒 13 min,用无菌水冲洗 4 次。

1.2.2 外植体获得和不定芽诱导 消毒后的种子接种在 MS 培养基中培养 2~3 d,待种子吸胀至刚长出胚根,去掉种皮后在子叶和下胚轴连接处去掉下胚轴后就可得到所需的子叶节外植体(每粒种子 2 个子叶节)。以每瓶 5 个外植体接种到 6-BA 1.0 mg/L 附加不同浓度 NAA(0.05、0.10、0.15 mg/L)和 6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.20 mg/L 的诱芽培养基上。3 次重复。

1.2.3 不定芽生根 在诱芽培养基中出现大量丛生的不定芽后,待芽长至 1.5 cm 左右时,切下不定芽插入到基本培养基为 1/2 MS 附加不同 IBA(0、0.5、1.0 mg/L)的培养基进行生根培养。

Abstract: The antifungal action of three kinds of *Cynanchum komarovii* extracts by using a mycelial growth method were tested against pathogen of *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*. The results showed that total alkaloids, steroidal saponins and total flavonoids of *Cynanchum komarovii* extracts had inhibiting effects to the mycelium growth of these pathogen when the extract concentration was 500 mg/L. Among of them, total alkaloids of *Cynanchum komarovii* had a better antifungal activity, and the inhibition rate was 85% against tomatoes pathogen. Meanwhile, the EC₅₀ of total alkaloids of *Cynanchum komarovii* against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea* were 84.3471 mg/L and 135.8679 mg/L respectively. Total alkaloids of *Cynanchum komarovii* could be botanical fungicide.

Key words: *Cynanchum komarovii*; antifungal activity; *Alternaria solani*; *Botrytis cinerea*