

# 瑞香狼毒中抑制植物病原真菌活性物质研究

卜春亚<sup>1,2</sup>, 成军<sup>2</sup>, 王有年<sup>1,2</sup>, 龚艺文<sup>1</sup>, 王重庆<sup>1</sup>, 师光禄<sup>1,2</sup>

(1. 北京农学院 生物科学与工程学院, 北京 102206; 2. 农业部都市农业(北方)重点开放实验室, 北京农学院, 北京 102206)

**摘 要:**以草莓灰葡萄孢霉、辣椒炭疽病菌、桃褐腐病菌、棉花红腐病菌、马铃薯干腐病菌植物病原真菌为试材,采用适于大规模分离抑菌活性物质的大孔树脂等分离技术从瑞香狼毒根中分离抑菌活性物质,并确定了瑞香狼毒根部抑菌活性物质提取工艺。结果表明:瑞香狼毒根宜用乙醇浸提法获得粗提浸膏,再用乙酸乙酯进一步萃取,随后用大孔树脂进一步分离,得到的组分9对灰葡萄孢霉等有较好的抑菌效果(半抑制浓度(IC<sub>50</sub>)值为0.39 mg/mL)。核磁鉴定组分9的主成分为狼毒色原酮,抑菌活性测定结果表明狼毒色原酮对草莓灰葡萄孢霉、桃褐腐病菌和辣椒炭疽病菌等均有较好的抑菌效果。

**关键词:**瑞香狼毒;抑菌活性;草莓灰葡萄孢霉;狼毒色原酮

**中图分类号:**S 482.2<sup>+</sup>92 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)19-0120-04

目前,有关药用植物杀虫活性物质研究比较深入,而药用植物抑菌、杀菌活性物质的研究相对较少<sup>[1]</sup>。从国内外研究现状看,多数还停留在植物粗提物离体试验研究上,植物源杀菌剂的研发将逐步成为当今农药领域研究的热点<sup>[1]</sup>。瑞香狼毒(*Stellera chamaejasme* L.)是草原有害生物,具有原料丰富等特点<sup>[2]</sup>。瑞香狼毒根部可入药,具有抗病毒、抗肿瘤等功效<sup>[3-4]</sup>。目前瑞香狼毒在杀虫活性物质方面研究较多,且已分离出一些杀虫成分并对其结构进行了鉴定<sup>[5-6]</sup>,亦有少量研究表明瑞香狼毒根粗提物对一些植物病原菌具有很好的抑制作用<sup>[7-8]</sup>。有报道瑞香狼毒根的乙酸乙酯萃取物对石膏样毛癣菌(*Trichophyton mentagrophyte*)等病菌具有较强的抑制作用<sup>[2,7]</sup>。但对瑞香狼毒防治草莓灰葡萄孢霉等植物病原真菌的研究,尤其是瑞香狼毒抗菌活性物质分离鉴定的研究报道较少。

大孔树脂,适合工业化生产,被广泛用于天然产物的分离纯化,但研究大孔树脂用于分离瑞香狼毒抑菌活性物

质的报道较少。该试验拟采用大孔树脂等分离纯化瑞香狼毒抑菌活性物质,研究其对灰葡萄孢霉等植物病原真菌的抑制作用,旨在分离鉴定瑞香狼毒根抑菌活性物质,以期为开发瑞香狼毒植物源杀菌剂提供科学的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

瑞香狼毒于2010年8月采自山西朔州市金沙滩,将瑞香狼毒根部清洗晾干后粉碎,过60目筛备用。辣椒炭疽病菌(*Colletotrichum acutatum*)、草莓灰葡萄孢霉(*Botrytis cinerea* Pers.)、马铃薯干腐病菌(*Pythium coeruleum*)、棉花红腐病菌(*Fusarium moniliforme*)和桃褐腐病菌(*Monilinia fructicola*)等菌种,由北京农学院植保教研室提供。

### 1.2 试验方法

1.2.1 瑞香狼毒根部活性成分的浸提 乙醇浸提法:称取瑞香狼毒根干粉2 kg,用5倍无水乙醇,室温浸泡5 d后过滤,滤渣继续浸泡3 d,重复3次,浸提液合并旋转蒸发仪浓缩后得到粗提浸膏。水提醇沉法:称取瑞香狼毒根干粉2 kg,水煮2次,每次30 min,溶液合并浓缩,浓缩液用70%乙醇浸泡2 d,弃沉淀取上清经浓缩后得到粗提浸膏。

1.2.2 瑞香狼毒浸膏萃取 瑞香狼毒粗提浸膏用石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯和正丁醇4种溶剂分别萃取,萃取3次,合并后浓缩得到提取物。将提取物分别旋转蒸发至干,称取每种提取物的质量,用下述公式计算各自的提取率:提取率(%)=提取物的质量(g)/材料干重(g)×100。

**第一作者简介:**卜春亚(1977-),女,浙江人,博士,讲师,现主要从事病虫害生物防治研究等工作。E-mail:buchunya@163.com。

**责任作者:**师光禄(1958-),男,山西人,博士,教授,现主要从事植物源农药研究等工作。

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(31200483);北京市自然科学基金资助项目(6122005);教育部科学技术重点研究资助项目(212001);北京市教育委员会科技计划面上资助项目(KM201210020001);农业部都市农业(北方)重点开放实验室开放研究资助项目(NYBBF-2011-R005);北京市教委平台建设资助项目(PXM2012\_014207\_000014)。

**收稿日期:**2013-05-20

1.2.3 大孔树脂分离活性物质 乙酸乙酯萃取物经过减压浓缩后,再用水混悬,将水混悬物上大孔树脂 RP-8,分别用 10%、30%、50%、70%、95% 的乙醇作为洗脱剂进行洗脱,对各洗脱组分进行活性测定,结果表明 30% 乙醇洗脱部分即组分 9 抑菌活性最高,通过高效液相色谱仪分离得到其主要成分,经核磁分析鉴定大孔树脂 30% 乙醇洗脱组分的主要成分。

### 1.3 项目测定

1.3.1 瑞香狼毒提取物对植物病原真菌的活性测定 将各种药剂样品分别配制成浓度为 2 mg/mL 的带药 PDA 平板,以相应的溶剂加入到培养基中作为对照平板,用直径 5 mm 的打孔器在培养好的菌落边缘切下带菌菌饼,将菌饼带菌的一面接种到培养皿中央。将各处理置于 28℃ 恒温箱中培养。每个处理设 3 次重复。定期观察菌落形态,并用十字交叉法测量菌落直径,计算抑制生长率。纯生长量=菌落平均直径-菌饼直径;抑菌率=[(对照纯生长量-处理纯生长量)×100/对照纯生长量]×100%。

1.3.2 狼毒色原酮对草莓灰霉病菌的抑菌活性测定 采用纸碟片法。用打孔器在滤纸上打直径为 6 mm 的圆片,放入试管中灭菌待用。用 5 mL 灭菌水从病菌斜面上洗下孢子,稀释至  $10^5$  个孢子/mL,取 200  $\mu$ L 均匀

地涂在 PDA 平板上。用 1% 吐温-80 灭菌水溶液配制 1 mg/mL 狼毒色原酮药液,以 1% 吐温-80 灭菌水溶液作对照。将灭菌纸片分别在药液和对照液中浸泡 30 min。随后将纸片放在平板等距离的 3 个点上,每个皿中放 2 个含药纸片和 1 个对照纸片,放在 28℃ 培养箱中培养,每日观察并记录结果。

### 1.4 数据分析

采用 SPSS 17.0 完成数据的方差分析和 Duncan's 检验,采用 GraphPad Prism 5 软件计算半抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 值。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同提取方法提取瑞香狼毒抑菌活性物质的效果比较

由表 1 可知,瑞香狼毒根乙醇浸提方法相对比水提醇沉方法提取效率更高一些。乙醇浸提获得的瑞香狼毒浸膏,随后用 4 种有机溶剂萃取,从这 4 种有机溶剂的萃取效率比较情况看,瑞香狼毒根乙酸乙酯萃取物对草莓灰葡萄孢霉的抑制活性最高,且其提取效率最高,石油醚、甲醇和二氯甲烷萃取物对草莓灰葡萄孢霉的抑菌效果相对差一些,抑制率均低于 50%。故选择瑞香狼毒根乙酸乙酯萃取物作进一步细分离。

表 1 瑞香狼毒提取物对草莓灰葡萄孢霉的抑菌活性及提取率比较

Table 1 Comparative analysis of extraction rate of various extracts from *S. chamaejasme* and inhibitory rate against *B. cinerea*

提取方法		甲醇	二氯甲烷	石油醚	乙酸乙酯
Extract methods		Methanol	Methylene	Benzene	Ethyl acetate
水提醇沉	抑菌率 Inhibitory rate/%	18.08±8.69	32.58±4.05	21.61±5.99	35.05±5.63
Aqueous extract	提取率 Extract rate/%	5.36	3.34	2.61	4.04
乙醇浸提	抑菌率 Inhibitory rate/%	40.11±4.63	35.31±3.83	47.01±1.91	51.00±2.50
Ethanol soluble extract	提取率 Extract rate/%	9.19	3.39	1.34	8.08

### 2.2 瑞香狼毒大孔树脂组分对草莓灰葡萄孢霉的抑制效果

由表 2 可知,30% 乙醇洗脱组分 9 对草莓灰葡萄孢霉的抑菌效果显著 ( $P<0.05$ ),抑菌率达到 50% 以上。对组分 9 对草莓灰葡萄孢霉的抑制效果和其浓度之间的相关性进行进一步研究发现,组分 9 对草莓灰葡萄孢霉的抑制效果和其浓度之间存在显著的正相关性(表 3),

表 2 大孔树脂各组分对草莓灰霉病菌的抑菌活性

Table 2 Inhibitory rate of various fractions from *S. chamaejasme* against *B. cinerea*

组分号	抑制百分率	组分号	抑制百分率
No.	Inhibitory rate/%	No.	Inhibitory rate/%
4	0.40±2.90	8	35.62±6.16
5	5.00±4.54	9	51.46±5.50
6	30.00±3.35	10	5.42±5.16
7	-0.62±1.04	11	0.40±0.64

表 3 组分 9 对草莓灰霉病菌的抑制效果

Table 3 Inhibitory effects of fraction No. 9 from *S. chamaejasme* against *B. cinerea*

浓度	抑制百分率
Concentrations/mg · mL <sup>-1</sup>	Inhibitory rate/%
4.00	71.30±4.00
2.00	63.70±3.80
1.00	53.50±3.00
0.50	52.10±3.10
0.25	36.90±4.20
0	0

采用 GraphPad Prism 5 软件计算组分 9 的  $IC_{50}$  值为 0.39 mg/mL。检测了组分 9 对其它病原真菌的抑制活性发现,组分 9 对所检测的 6 种病原真菌都有较好的抑菌效果,特别是对桃褐腐病菌、草莓灰葡萄孢霉、辣椒炭疽病菌、棉花红腐病菌等病原真菌有较好的抑菌效果,抑菌率达到 50% 以上(表 4)。

表 4

组分 9 和狼毒色原酮对几种病原真菌的抑菌活性

Table 4

Inhibitory effects of fraction No. 9 and chamaechromone from *S. chamaejasme* against various fungi

病原真菌 Pathogen	组分 9 抑制百分率 Inhibitory rate/%	狼毒色原酮 抑菌圈直径 Inhibition zone diameter/mm	病原真菌 Pathogen	组分 9 抑制百分率 Inhibitory rate/%	狼毒色原酮 抑菌圈直径 Inhibition zone diameter/mm
草莓灰葡萄孢霉 <i>B. cinerea</i>	64.50±3.40	10.00±1.90	马铃薯干腐病菌 <i>F. solani</i>	28.90±3.50	3.62±2.16
桃褐腐病菌 <i>M. fruticola</i>	77.70±3.00	12.00±1.54	茄子黄萎病菌 <i>V. dahliae</i>	45.30±4.40	4.46±1.50
辣椒炭疽病菌 <i>C. acutatum</i>	60.50±2.30	7.00±1.35	棉花红腐病菌 <i>F. moniliforme</i>	54.70±2.00	4.92±1.16

### 2.3 瑞香狼毒大孔树脂洗脱组分 9 进一步分离和鉴定

采用高效液相色谱仪(HPLC)进一步分离大孔树脂洗脱组分 9 的主要成分,用核磁分析鉴定其主成分。根据其光谱数据,并经与同种植物中分离到的狼毒色原酮进行比较,二者的熔点、旋光 and  $^{13}\text{C-NMR}$  的数据基本一致,因此,该化合物与文献报道的狼毒色原酮(Chamaechromone)应为同一个化合物<sup>[8-9]</sup>,故大孔树脂洗脱组分 9 的主成分被鉴定为狼毒色原酮。

### 2.4 狼毒色原酮对草莓灰葡萄孢霉等病原真菌的抑菌活性

通过纸碟片法发现狼毒色原酮对草莓灰葡萄孢霉、桃褐腐病菌、辣椒炭疽病菌均有抑菌效果,其中对桃褐腐病菌的抑菌效果最好,抑菌圈为 12 mm,对草莓灰霉病菌的抑菌圈为 10 mm,对辣椒炭疽病菌的抑菌圈为 7 mm(表 4)。

## 3 结论与讨论

该试验结果表明,采用乙醇浸提、乙酸乙酯萃取和大孔树脂分离的提取工艺,能较好的分离抑菌活性物质。瑞香狼毒根乙酸乙酯萃取物中包含的组分非常复杂,分离其主要抑菌活性物质有一定的困难。大孔树脂近年来广泛应用于天然产物的分离,具有优良的吸附能力,有高效、价格低廉、易再生等特性,非常适用于工业化大规模分离活性物质<sup>[10]</sup>。该研究采用大孔树脂成功分离到了有较高抑菌活性的组分,发现瑞香狼毒根部大孔树脂洗脱组分 9 对草莓灰葡萄孢霉有较好的抑菌效果,计算其  $\text{IC}_{50}$  值为 0.39 mg/mL,且组分 9 对其它植物病原真菌也有较好的抑菌效果,有较广的抑菌谱,说明大孔树脂分离方法适用于瑞香狼毒根抑菌活性物质的大规模分离。

大孔树脂分离到的瑞香狼毒根组分 9 具有广谱的抑菌活性,显示其可能蕴含瑞香狼毒根的主要抑菌活性物质,因此,该研究采用 HPLC 对组分 9 的主成分进行了进一步分离,用核磁鉴定组分 9 的主要活性物质为狼毒色原酮。随后,用碟片法进一步测定了狼毒色原酮的抑菌活性,发现狼毒色原酮对所检测的草莓灰葡萄孢霉、桃褐腐病菌、辣椒炭疽病菌等均有较好的抑菌活性。由此可以推断,狼毒色原酮可能是瑞香狼毒根的主要抑菌活性物质之一。狼毒色原酮对草莓灰葡萄孢霉、桃褐

腐病菌和辣椒炭疽病菌的抑菌活性,尚属首次报道。秦宝福等<sup>[11]</sup>报道从瑞香狼毒根中分离到狼毒色原酮,发现它对苹果干腐病菌、小麦赤霉病菌、番茄早疫病菌、南瓜枯萎病菌、玉米大斑病菌、烟草赤星病菌和辣椒疫霉病菌均有一定的抑菌作用。张国洲等<sup>[12]</sup>报道狼毒色原酮等对菜粉蝶具有杀虫活性。王玉华等<sup>[13]</sup>报道狼毒色原酮对人肝癌 SMMC-7721 细胞有一定的抗肿瘤活性,对狗肾 MDCK 细胞具有较弱的细胞毒性。刘耀红等<sup>[14]</sup>研究发现,狼毒色原酮对一些水产病原菌和哺乳动物病原菌亦有较强的抑菌活性。张武岗等<sup>[15]</sup>报道狼毒色原酮对乳房链球菌和无乳链球菌有一定的抑菌活性。综上所述,狼毒色原酮可能是瑞香狼毒根的主要广谱性抑菌活性物质之一。狼毒色原酮作为一种广谱的抑菌活性物质,有望在农药开发方面有所应用,可为开发环境友好型的植物病虫害控制剂提供更多选择。

## 参考文献

- [1] 谢小梅,许杨. 抗真菌中药的作用机理研究进展[J]. 中国中药杂志, 2004,29(3):200-202.
- [2] 温哲屹,师光禄,苏学友,等. 瑞香狼毒提取物对病原菌及桃霉的生物活性研究[J]. 北京农学院学报,2008,23(1):25-29.
- [3] Feng B M, Wang T, Zhang Y, et al. Aldose reductase inhibitors from *Stellera chamaejasme*[J]. Pharmaceutical Biology,2005,43(1):12-14.
- [4] Yang G H, Chen D F. Billavanones, flavonoids, and coumarins from the roots of *Stellera chamaejasme* and their antiviral effect on hepatitis B virus[J]. Chemistry and Biodiversity,2008,5(7):1612-1872.
- [5] 张国洲,王亚维,徐汉虹,等. 瑞香狼毒杀虫活性成分的提取与分离(I)[J]. 安徽农业大学学报,2000,27(4):340-344.
- [6] 张国洲,王亚维,徐汉虹,等. 瑞香狼毒杀虫活性成分的提取与分离(II)[J]. 安徽农业大学学报,2000,27(4):345-347.
- [7] 龚晓霞,李文娟,欧阳秋,等. 瑞香狼毒根中抑菌活性成分的研究[J]. 四川大学学报(自然科学版),2006,43(3):697-701.
- [8] Niwa M, Liu G Q, Tatsumatsu S, et al. Chamaechromone, a novel rearranged biflavanonoid from *Stellera chamaejasme* L. [J]. Tetrahedron Letters, 1984,25(34):3735-3738.
- [9] Niwa M, Otsuji S, Tatsumatsu S, et al. Stereostructures of two biflavanones from *Stellera chamaejasme* [J]. L Chem Pharm Bull, 1986,34:3249-3251.
- [10] 李淑珍,李进,杨志江,等. 大孔树脂分离纯化黑果枸杞总黄酮的研究[J]. 食品科学,2009,30(1):19-24.
- [11] 秦宝福,周乐,苗芳,等. 瑞香狼毒根的抑菌活性研究(I)[J]. 西北植物学报,2003,23(11):1977-1980.
- [12] 张国洲,徐汉虹,王亚维,等. 瑞香狼毒根与狼毒色原酮对昆虫的拒食和胃毒作用[J]. 青海大学学报,2001,19(6):1-3.



- [13] 王玉华,杨夏,孙丽君,等. 蒙药材瑞香狼毒体外细胞毒性的研究[J]. 中国医药生物技术,2012,7(1):9-13.  
[14] 刘耀红,李福华,周乐,等. 瑞香狼毒根丙酮提取物对几种动物病原

- 菌的抑制作用[J]. 西北农业学报,2008,17(6):184-186.  
[15] 张武岗,李定刚,宋毓民,等. 新狼毒素 B 及其衍生物的抑菌活性研究[J]. 动物医学进展,2005,26(11):66-69.

## Studying on Antifungal Compounds from Root Extracts of *Stellera chamaejasme* Against Plant Pathogenic Fungi

BU Chun-ya<sup>1,2</sup>, CHENG Jun<sup>2</sup>, WANG You-nian<sup>1,2</sup>, GONG Yi-wen<sup>1</sup>, WANG Chong-qing<sup>1</sup>, SHI Guang-lu<sup>1,2</sup>

(1. College of Biological Science and Engineering, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206; 2. Key Laboratory of Urban Agriculture (North) of Ministry of Agriculture P. R. China, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206)

**Abstract:** Taking *Botrytis cinerea* Pers., *Colletotrichum acutatum*, *Monilinia fructicola*, *Fusarium moniliforme* and *Pythium coeruleum* as test fungi, screening antifungal compounds from the root crude extracts of *Stellera chamaejasme*, and separated the major antifungal compounds from *Stellera chamaejasme* through adapting the macroporous resin, which was suitable for the large-scale separation, the antifungal compounds extraction process were established. The results showed that the ethanol extraction followed by ethyl acetate partition, could better isolate antifungal compounds from root of *S. chamaejasme*. The antifungal components of ethyl acetate extract of *S. chamaejasme* were further efficiently partitioned using the macroporous resin. The 9<sup>th</sup> elution fraction eluted from macroporous resin column was found to have highest antifungal activity against *B. cinerea* with an IC<sub>50</sub> value of 0.39 mg/mL. The main component of the 9<sup>th</sup> fraction of *S. chamaejasme* was separated and identified as chamaechromone using HPLC and NMR. Chamaechromone was first found to be able to effectively inhibit the growth of mycelium of *B. cinerea*, *C. acutatum*, and *M. fructicola*.

**Key words:** *Stellera chamaejasme*; *Botrytis cinerea* Pers.; antifungal compounds; chamaechromone

中国科技核心期刊、中国农业核心期刊、全国中文核心期刊、全国优秀农业期刊

## 《植物遗传资源学报》征订启事

《植物遗传资源学报》是由中国农业科学院作物科学研究所和中国农学会主办的学术期刊,为中国科技论文统计源期刊、中国科学引文数据库来源期刊(核心期刊)、中国核心期刊(遴选)数据库收录期刊、中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊,又被《中国生物学文摘》和中国生物学文献数据库、中文科技期刊数据库收录。据 2011 年度中国期刊引证研究报告统计,《植物遗传资源学报》影响因子 1.396,在自然科学与工程技术类学科排序第 9 名。

本刊报道内容为大田、园艺作物,观赏、药用植物,林用植物、草类植物及其一切经济植物的有关植物遗传资源基础理论研究、应用研究方面的研究成果、创新性学术论文和高水平综述或评论。诸如,种质资源的考察、收集、保存、评价、利用、创新,信息学、管理学等;起源、演化、分类等系统学;基因发掘、鉴定、克隆、基因文库建立、遗传多样性研究。

双月刊,大 16 开本,196 页。定价 20 元,全年 120 元。各地邮局发行。

邮发代号:82-643。国内刊号 CN 11-4996/S,国际统一刊号 ISSN 1672-1810。

本刊编辑部常年办理订阅手续,如需邮挂每期另加 3 元。

地址:北京市中关村南大街 12 号 中国农业科学院《植物遗传资源学报》编辑部

邮编:100081 电话:010-82105794 010-82105796(兼传真)

网址:www.zwyczy.cn E-mail:zwyczyxb2003@163.com zwyczyxb2003@sina.com

