

苦参有效成分对辣椒枯萎菌的抑菌活性

郑玉艳

(辽宁农业职业技术学院, 辽宁 营口 115009)

摘 要:采用生长速率法和悬滴法测试了不同浓度苦参提取物、黄酮类化合物及生物碱对辣椒枯萎病的抑菌活性。结果表明:苦参提取物对辣椒枯萎菌菌丝生长和孢子萌发均有很强的抑制作用。在供试质量浓度 40 g/L 时,对辣椒枯萎菌菌丝生长、孢子萌发抑制率分别达到 94.48%、89.01%;并且黄酮类化合物抑菌活性显著高于生物碱。

关键词:苦参;辣椒枯萎病;抑菌活性

中图分类号:S 482.2⁺92 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)22-0124-02

近年来,随着人们环保意识的增强。植物源农药因其来源于自然,具有环保、长效、易光解、无残留等特点,成为发展有机农业、促进农业可持续发展的理想农药^[1]。

大量研究表明,苦参对多种病菌具有较强的生物活性。段泽敏等^[2]研究表明,苦参的无菌水、无水乙醇以及石油醚提取物对苹果腐烂病菌的抑制作用很强。张磊等^[3]研究表明,苦参粗提液可以提高茄子对黄萎病的抗病性。目前,有关苦参的多数研究,只是停留在苦参的粗提物直接用于病虫害防治上,对苦参生物活性成分的研究甚少,以致以哪种成分作为这些植物源农药质量控制的标准也成问题。因此如何从化学成分上研究苦参的生物活性值得进一步探讨。该试验通过研究苦参对辣椒枯萎病的抑菌活性,旨在对苦参有效成分的抑菌活性做进一步探讨,为苦参的推广应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试植物 苦参为常见药用植物材料,供试部位为根部,购于沈阳农业大学校医院。

1.1.2 供试菌种 辣椒枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. capsicum)由沈阳农业大学园艺学院蔬菜栽培生理与生态实验室提供。

1.2 试验方法

1.2.1 提取 采用超声波提取法(UAE),称取苦参粉末,按 1:10 质量浓度加入 60%乙醇浸泡 6 h,用 KQ-100DB 型超声波数控清洗器(50℃,20 kHz,250 W)提取 30 min,过滤,滤渣再用 60%乙醇提取 2 次,合并滤液,浓缩后放冰箱中备用。

1.2.2 溶剂萃取法提纯苦参黄酮类化合物 取上述

浓缩液经石油醚脱酯后,加入等量乙酸乙酯萃取 3 次,合并萃取液,减压浓缩,进行冷冻干燥得黄色粉末为苦参黄酮类化合物。

1.2.3 碱提酸沉法提纯苦参生物碱 取上述浓缩液减压蒸馏,除尽乙醇,膏状物用乙酸乙酯溶解后,用 2%盐酸调 pH 为 3,冰箱放置过夜,过滤。取滤液用乙醚反复萃取,弃去醚层,合并水层,用碳酸钠调 pH 为 9,用等体积的三氯甲烷萃取至无生物碱反应(用改良碘化铋钾试剂检测,无桔黄色沉淀出现),合并三氯甲烷萃取液,旋转蒸发回收三氯甲烷得褐色生物碱。

1.2.4 马铃薯-葡萄糖-琼脂培养基(PDA)制作^[4] 采用生长速率法测定苦参提取物对辣椒枯萎病菌的抑菌活性:将制备好的苦参提取液 1 mL,加入到 99 mL 已融化并冷却至 40℃的灭菌 PDA 培养基中(即提取物质量浓度为 10 g/L),混合均匀后倒入培养皿中制成带药培养基,3 次重复,以有机溶剂的 PDA 培养基作为对照(CK)。然后在无菌条件下,分别接上直径为 6.38 mm 经纯培养的枯萎菌菌丝圆片,24℃下暗培养,培养数天后用十字交叉法测定菌落直径,并计算抑菌率。菌落生长直径(mm)=菌落直径平均值-6.38;抑制率=(对照菌落直径-处理菌落直径)/对照菌落直径×100%。分生孢子悬浮液的制备:在已灭菌的 200 mL 马铃薯-葡萄糖液体培养基中接入 4 片直径为 6.38 mm 经纯培养的枯萎菌菌丝圆片,在振荡培养箱中 24℃振荡培养 14 d,过滤、离心。取下层孢子溶液用无菌水稀释,在低倍显微镜下 1 个视野约 50 个左右的孢子,浓度约为 1×10^6 个/mL,放入冰箱中备用。悬滴法测试苦参提取物对枯萎菌分生孢子萌发的影响:将提取物分别稀释 50 倍,取 10 μ L 稀释液与 10 μ L 辣椒枯萎菌分生孢子悬浮液于载玻片上混合(即提取物质量浓度为 10 g/L),于 24℃保湿悬滴培养,16 h 后镜检结果,记录孢子萌发个数和总孢子个数,计算萌发率和抑制率。以清水处理作为空白对照(CK)。每次试验均设含有 50%乙醇的 PDA 平板培养基。6 次重复。孢子萌发率=孢子萌发数/检查孢

作者简介:郑玉艳(1982-),女,硕士,助教,研究方向为蔬菜栽培生理与生态。E-mail:zhengyuyan820115@163.com。

基金项目:国家“863”计划资助项目(2004AA247010)。

收稿日期:2011-08-23

子总数 $\times 100\%$; 抑制率 = (对照孢子萌发率 - 处理孢子萌发率) / 对照孢子萌发率 $\times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 苦参粗提液的抑菌活性分析

由表 1 可知, 乙酸乙酯提取苦参, 随着苦参粗提液质量浓度的增大, 对枯萎病菌菌丝生长及孢子萌发抑制作用增强, 并且抑制率差异显著。在质量浓度 10 g/L 时, 菌丝生长抑制率达到 61.45%; 孢子萌发抑制率达到 72.70%。苦参粗提液质量浓度在 40 g/L 时, 对菌丝生长及孢子萌发抑制率分别达到 94.48%、89.01%。抑菌率分别增长 34.96%、18.32%。苦参粗提物表现出很强的抑菌活性。

表 1 不同浓度苦参提取物的抑菌活性

处理 / g · L ⁻¹	菌丝生长抑制率 / %	孢子萌发抑制率 / %
5	30.89e	67.22e
10	61.45d	72.70d
20	79.45c	78.37c
30	86.49b	81.69b
40	94.48a	89.01a

注: 小写字母表示在 5% 水平的显著性。下同。

2.2 苦参抑菌活性成分分析

由表 2 可知, 苦参黄酮类化合物与生物碱提取液对辣椒枯萎病菌的离体抑菌生物活性在各浓度间均存在显著性差异, 并且均随浓度的增大, 抑菌作用增强。黄酮类化合物在 1 g/L 与生物碱 4 g/L 时, 菌丝生长抑制率达到同一水平, 不存在显著性差异; 黄酮类化合物在 0.5 g/L 与生物碱 2 g/L 时, 对病菌孢子萌发抑制率差异亦不显著。在相同质量浓度下, 黄酮类化合物提取液对病菌菌丝生长及孢子萌发抑制率与生物碱的抑菌率差异均达显著水平。黄酮类化合物在 4 g/L 时, 菌丝生长抑制率达到 95.55%; 在 2 g/L 时, 孢子萌发抑制率达到 98.16%。总黄酮对辣椒枯萎病菌的抑菌活性显著强于总生物碱。

3 讨论

在苦参的化学成分方面, 前人做了大量工作, 从苦参中已分离出 27 种生物碱及 56 种黄酮类化合物等次生代谢物。但是这些化合物在农业杀虫抑菌活性方面研究较少, 并且新化合物的发现报道越来越少。

表 2 苦参有效成分黄酮类化合物及生物碱对辣椒枯萎病菌的抑菌活性

提取液	浓度 / g · L ⁻¹	菌丝生长抑制率 / %	浓度 / g · L ⁻¹	孢子萌发抑制率 / %
黄酮类化合物	0.25	50.5454e	0.125	50.2558e
	0.5	68.2262d	0.25	67.2013d
	1	74.0972c	0.5	70.6833c
	2	83.6589b	1	87.7382b
	4	95.5485a	2	98.1558a
生物碱	0.25	4.1335h	0.125	2.624h
	0.5	6.1379h	0.25	11.6593g
	1	13.4624g	0.5	25.9463f
	2	28.2932f	1	51.3401e
	4	73.677c	2	72.4577c

苦参在农业上的应用还相对薄弱, 作用机理研究更是空白。因此, 借用医学上已有的关于苦参在杀虫抑菌、杀原生动物方面的临床和药理知识, 开展更广泛的农业生物活性的筛选及其有效成分的分离鉴定, 并进行作用机理研究是非常必要的, 这是今后苦参农业应用研究的方向。总之, 数千年以来, 人们一直沿用植物源生物农药, 使抑菌杀虫与病虫害长期协同进化着。植物源生物农药这门古老的学科, 在利用高精仪器和现代生物技术的今天, 必将焕发出新的灿烂的亮点。它不仅是我国农药工业的一个发展方向, 也是世界农药业发展的一个方向, 同时也是保护环境、维护生态健康、人类安全的需要。

参考文献

- [1] 操海群, 岳永德, 花日茂, 等. 植物源农药研究进展 (综述) [J]. 安徽农业大学学报, 2000, 27(1): 40-44.
- [2] 段泽敏, 王贤萍, 周柏玲, 等. 苹果树腐烂病无公害防治技术研究 [J]. 山西农业科学, 2002, 30(4): 55-57.
- [3] 张磊, 周宝利, 张淑红, 等. 三种植物提取物对茄黄萎病菌生长和与茄幼苗抗性有关生理指标的影响 [J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(5): 989-990.
- [4] 郭长合. 苦参在农药中的应用 [J]. 农药科学与管理, 2001, 22(4): 27-28.
- [5] 齐景伟, 关红, 乌云, 等. 苦参生物碱的提取分离及抗寄生虫作用的研究 [J]. 内蒙古畜牧科学, 2003(3): 5-7.
- [6] 吴钜文, 陈建峰. 植物源农药及其安全性 [J]. 植物保护, 2002, 28(4): 39-41.
- [7] 袁静, 张宗俭, 丛斌. 苦参碱的生物活性及其研究进展 [J]. 农药, 2003, 42(7): 1-4.

Antifungal Activity of *Sophora flavescens* Ait Extracts Against Capsicum Blight

ZHENG Yu-yan

(Liaoning Agricultural College, Yingkou, Liaoning 115009)

Abstract: The crude extracts of *Sophora flavescens* Ait and flavone and alkaloid were bioassayed by using growth rate and pendant-drop methods for antifungal activity of Capsicum blight at different concentrations. The results showed that crude extracts performed significant antifungal activity. The inhibition rate was 94.48% on mycelium growth and the inhibition rate on the spore germination was 89.01% as the concentration was 40 g/L. And the antifungal activity of flavone were more active than alkaloid.

Key words: *Sophora flavescens* Ait; Capsicum blight; antifungal activity