

◆ 药效与应用 ◆

5种南药植物提取物对致病疫霉的抑制作用

王红刚¹, 陈银华¹, 林江², 耿梦婷¹, 张瑞¹, 邱煜荣², 王文桥^{3*}

(1. 海南大学热带作物学院, 海口 570228; 2. 海南大学林学院, 海口 570228; 3. 河北省农林科学院植物保护研究所, 河北保定 071000)

摘要:为了筛选防治晚疫病有效的植物资源, 测试了5种南药植物粗提物及其中九里香粗提物5种萃取组分对致病疫霉的抑制作用。结果表明, 九里香粗提物抑菌活性较高, 对抑制致病疫霉菌丝生长、休止孢萌发及休止孢侵染离体叶片的 EC_{50} 值分别为6.51 mg/mL、3.77 mg/mL和19.56 mg/mL。九里香粗提物萃取组分中, 石油醚萃取组分活性较高, 对抑制致病疫霉菌丝生长、休止孢萌发及休止孢侵染离体叶片的 EC_{50} 值分别为2.87 mg/mL、1.85 mg/mL和8.67 mg/mL。九里香乙醇粗提物和石油醚萃取组分对晚疫病的防效较好。

关键词:南药植物; 提取物; 分离组分; 致病疫霉; 抑菌活性

中图分类号: S482.2+92 文献标志码: A doi: 10.3969/j.issn.1671-5284.2020.04.010

Inhibitory Effect of 5 Southern Herbs Extracts against *Phytophthora infestans*

WANG Honggang¹, CHEN Yinhu¹, LIN Jiang², GENG Mengting¹, ZHANG Rui¹, QIU Yurong², WANG Wenqiao^{3*}

(1. College of Tropical Crops, Hainan University, Haikou 570228, China; 2. College of Forestry, Hainan University, Haikou 570228, China; 3. Institute of Plant Protection, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Hebei Baoding 071000, China)

Abstract: In order to screen effective plant resources to control *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, inhibitory effect of crude extracts from 5 southern herbs and 5 fractions from the crude extract of *Murraya Paniculata* L. against *P. infestans* was tested. The results showed that the crude extract from *M. Paniculata* L. had highly inhibitory activity with EC_{50} values 6.51 mg/mL, 3.77 mg/mL and 19.56 mg/mL for mycelial growth, germination of cystospores and infection to detached leaves of *P. infestans*, respectively. Among the extracted fractions from *M. Paniculata* L. extract, the fraction from petroleum benzene was more active, and the EC_{50} values against mycelial growth, germination of cystospores and infection to detached leaves of *P. infestans* were 2.87 mg/mL, 1.85 mg/mL and 8.67 mg/mL, respectively. The ethanol extract of *M. Paniculata* L. and the petroleum benzene fraction had better control effect to late blight.

Key words: southern herbs; extracts; separated fraction; *Phytophthora infestans*; antifungal activity

致病疫霉 [*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary] 引起的晚疫病是番茄生产中的重要病害^[1], 主要依靠化学农药防治。由于致病疫霉对现用内吸性杀菌剂甲霜灵、嘧霉灵等产生抗性使药效降低^[2], 化学杀菌剂超量使用导致农药残留超标^[3], 所以利用植物中丰富多样的天然抗性成分及对天然产物模拟开发新型杀菌剂已成为农药创制的重要途径和

方法^[4]。据报道, 五倍子、菊科植物旋覆花、知母等药用植物提取物对致病疫霉有较好的抑菌活性^[5-7]。

南药指长江以南的热带、亚热带地区, 传统指广东、海南、广西、福建南部、台湾、云南所产的地道药材^[8]。海南省南药资源丰富, 在进行植物抗性物质筛选研究方面具有资源优势。研究报道, 几种南药植物提取物有一定的杀虫和除草活性^[9-10]。多种南药

收稿日期: 2020-03-08

基金项目: 海南省自然科学基金(318MS017); 国家重点研发计划(2016YFD0201000)

作者简介: 王红刚(1982—), 男, 河北磁县人, 硕士, 讲师, 主要从事杀菌剂应用技术研究。E-mail: deru666@163.com

通信作者: 王文桥(1963—), 男, 湖北洪湖人, 博士, 研究员, 主要从事植物病原菌抗药性及杀菌剂应用技术研究。E-mail: wenqiao@163.com

植物提取物对香蕉炭疽病菌、水稻稻瘟病菌、番石榴拟盘多毛孢等病原菌的抑菌活性较高^[11-17],目前尚未见南药提取物及其分离组分对致病疫霉活性的相关研究报道。笔者在前期研究的基础上,选用了5种有抑菌活性的南药植物,测试了乙醇提取物对致病疫霉的活性,并对抑菌活性较高的九里香粗提物初步分离后测定分离组分的抑菌活性,旨在明确5种南药植物粗提物及其中九里香粗提物分离组分对致病疫霉的抑制作用,为南药资源抗菌活性物开发利用和植物病害防治提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试植物提取物

九里香 (*Murraya paniculata*)、阴香 (*Cinnamomum burmanni*)、黄皮 (*Clausena lansium*)、胡椒 (*Piper nigrum*)、槟榔 (*Areca catechu*),采自海南大学儋州校区及附近农场,采集部位均为叶片,经海南大学植物学学科罗丽娟教授鉴定为所需供试材料,阴干粉碎得干粉,过40目筛。

1.1.2 供试菌株

致病疫霉 (*Phytophthora infestans*),从海南省昌江黎族自治县乌烈镇乌烈村采集番茄晚疫病病叶,分离纯化后得到菌株CJ-13,通过显微镜观察菌丝和孢子囊形态并由河北省农科院植保所王文桥研究员鉴定为所需供试菌株。保存于10℃、试管中RSA培养基(黑麦60 g、蔗糖20 g、琼脂15 g、蒸馏水1 000 mL)斜面上,从试管中RSA培养基斜面上挑取菌丝体转接至培养皿中RSA培养基平板上,置于18℃条件下培养活化,用于抑菌活性测定;在培养菌株

CJ-13的RSA培养基平板上加入无菌水,用灭菌毛刷刷取菌丝,两层纱布过滤,将孢子囊悬浮液接种于易感晚疫病的番茄(品种“玉女”)离体叶片上,18℃保湿培养4 d,将叶片上产生的孢子囊用于测定南药提取物的抑菌活性。

1.1.3 供试植物

花盆中种植“玉女”番茄幼苗,1株/盆,每月施由45%复合肥(N:P₂O₅:K₂O)配制的0.2%营养液2次,待植株长至5片复叶后用于盆栽植株试验。

1.2 方法

1.2.1 5种南药植物粗提物浸膏的制备和九里香粗提物初分离

参照王红刚等^[8]的方法,将5种供试干粉分别用95%乙醇提取2次,合并提取液并浓缩得到浸膏。九里香粗提物浸膏加蒸馏水悬浮,顺次用极性由低到高的4种溶剂石油醚、氯仿、乙酸乙酯和水饱和正丁醇萃取,减压浓缩得到5种萃取组分浸膏。

1.2.2 室内毒力和防治效果测定方法

5种南药植物粗提物浸膏以95%乙醇溶解并配置200 mg/mL的最高质量浓度,倍量稀释为8个系列质量浓度稀释液;萃取组分设置最高质量浓度100 mg/mL,倍量稀释得到7个质量浓度。

菌丝生长速率法测定系列浓度稀释液对供试病菌菌丝生长的抑菌活性。在直径为9 cm的培养皿中RSA培养基平板表面加入稀释液,每皿0.27 mL,每处理3皿,对照加等量95%乙醇,用玻璃涂棒涂匀,挥干后,于平板中央接种致病疫霉直径0.5 cm的菌饼,每皿1个,盖上培养皿盖并用Parafilm膜密封。放于18℃培养箱5~6 d,直尺十字交叉测量培养皿中菌落直径,计算抑制率。

$$\text{抑制率}/\% = \frac{\text{对照菌落测量直径} - \text{处理菌落测量直径}}{\text{对照菌落测量直径} - \text{菌饼直径}} \times 100 \quad (1)$$

按照王树桐等^[7]的方法测定供试稀释液对供试病菌休止孢萌发的抑制作用。制备含系列浓度稀释液的RSA培养基平板,对照加等量95%乙醇,溶剂挥干。孢子囊10℃下放置3 h,用蒸馏水稀释得到所需休止孢悬浮液,于含药平板展匀(0.1 mL/皿)。18℃培养24 h,10×10倍镜检总数和萌发数,每处理4皿,每皿10视野。萌发标准为芽管直径比休止孢直径长。计算萌发率和稀释液对休止孢萌发的抑制率。

$$\text{抑制率}/\% = \frac{\text{对照萌发率} - \text{处理萌发率}}{\text{对照萌发率}} \times 100 \quad (2)$$

采用离体叶片法^[19]测定稀释液对致病疫霉休止

孢侵染离体叶片的抑菌活性。在Potter喷雾塔 1.03×10^5 Pa的压力下将稀释液喷于大小一致的番茄叶背,每处理喷1 mL,沉降30 s,95%乙醇做对照。将1 mL配制的萌发休止孢悬浮液喷于叶背,18℃培养箱16 h+8 h光暗交替3~4 d调查。按发病面积占叶片面积的百分比分级,参照王文桥等^[20]的分级标准,3次重复,计算病情指数及相对防效。

根据盆栽幼苗法^[21]测定稀释液对晚疫病的防治效果。5种南药植物粗提物及九里香粗提物分离组分设置质量浓度为50 mg/mL,每株番茄分别用喉头喷雾器均匀喷雾对应稀释液10 mL,95%乙醇做对照,

24 h后每株喷雾接种致病疫霉孢子囊悬浮液(浓度 1×10^5 孢子囊/mL) 10 mL, 18℃培养室中16 h+8 h光暗交替培养3~4 d调查, 4次重复, 计算病情指数和防效。

$$\text{病情指数}/\% = \frac{\sum(\text{各级病叶数} \times \text{相应级数值})}{\text{调查总数} \times 9} \times 100 \quad (3)$$

$$\text{防治效果}/\% = \frac{\text{对照病情指数} - \text{处理病情指数}}{\text{对照病情指数}} \times 100 \quad (4)$$

1.2.3 数据处理

采用Excel 2013和SPSS 20.0进行实验数据处理和分析。

2 结果与分析

2.1 5种南药植物叶片乙醇粗提物对致病疫霉的抑菌活性

由表1可知, 5种南药植物粗提物对致病疫霉均有一定抑菌活性, 其中九里香粗提物抑菌活性最高, 对致病疫霉菌丝生长、休止孢萌发和休止孢侵染离体叶片的 EC_{50} 值分别为6.51 mg/mL、3.77 mg/mL和19.56 mg/mL, 显著高于阴香粗提物对致病疫霉菌丝生长、休止孢萌发和休止孢侵染离体叶片的 EC_{50} 值17.37 mg/mL、8.59 mg/mL和41.76 mg/mL; 阴香粗提物对致病疫霉菌丝生长、休止孢萌发和休止孢侵染离体叶片的抑制作用又显著高于黄皮、槟榔和胡椒粗提物。九里香粗提物对致病疫霉休止孢萌发的 EC_{50} 值为3.77 mg/mL, 显著低于对致病疫霉菌丝生长的 EC_{50} 值6.51 mg/mL和对致病疫霉菌休止孢侵染离体叶片的 EC_{50} 值19.56 mg/mL, 可见九里香粗提物抑制致病疫霉休止孢萌发最有效。

表1 5种南药植物粗提物对致病疫霉离体及活体抑制作用

植物名称	$EC_{50}/(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$		
	菌丝生长	休止孢萌发	休止孢侵染离体叶片
九里香	6.51 ± 0.17 a	3.77 ± 0.52 a	19.56 ± 1.84 a
阴香	17.37 ± 0.94 b	8.59 ± 1.37 b	41.76 ± 2.79 b
黄皮	35.72 ± 0.89 c	22.74 ± 1.79 c	81.22 ± 2.86 c
槟榔	72.75 ± 1.77 d	37.57 ± 2.87 d	156.54 ± 4.52 d
胡椒	95.36 ± 2.52 e	68.91 ± 4.51 e	199.82 ± 6.91 e

注: 表中同列不同字母表示 $P < 0.05$ 水平差异显著, 下同。

2.2 5种南药植物粗提物对晚疫病的防治效果

由表2可知, 5种南药植物粗提物对晚疫病均有一定的防效。其中九里香粗提物防效最高, 可达91.61%, 显著高于阴香粗提物的防效(80.73%), 阴香粗提物的防效又分别显著高于黄皮粗提物的防效(68.01%)、槟榔粗提物的防效(46.07%)及胡椒粗

提物的防效(19.93%)。

表2 5种南药植物粗提物对晚疫病的防效

植物名称	病情指数	防效/%
对照	89.46 ± 4.31 a	
九里香	7.51 ± 0.94 f	91.61 ± 3.15 a
阴香	17.24 ± 1.32 e	80.73 ± 3.21 b
黄皮	28.76 ± 2.07 d	68.01 ± 2.94 c
槟榔	48.25 ± 2.89 c	46.07 ± 3.01 d
胡椒	71.63 ± 3.28 b	19.93 ± 2.25 e

注: 处理浓度为50 mg/mL。

2.3 九里香粗提物各萃取组分对致病疫霉的抑制作用

由表3可知, 九里香粗提物各萃取组分中石油醚和氯仿萃取组分对致病疫霉的抑制作用显著高于乙酸乙酯萃取组分、正丁醇萃取组分和水相的抑制作用。石油醚萃取组分对致病疫霉菌丝生长 EC_{50} 值为2.87 mg/mL, 对致病疫霉休止孢萌发 EC_{50} 值为1.85 mg/mL, 对致病疫霉休止孢侵染离体叶片的 EC_{50} 值为8.67 mg/mL; 氯仿和石油醚萃取组分对休止孢萌发的抑制作用差异不显著。

表3 九里香粗提物不同萃取组分对致病疫霉离体及活体抑制作用

植物名称	$EC_{50}/(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$		
	菌丝生长	休止孢萌发	休止孢侵染离体叶片
石油醚	2.87 ± 0.26 a	1.85 ± 0.32 a	8.67 ± 1.46 a
氯仿	5.91 ± 0.19 b	1.86 ± 0.44 a	15.72 ± 1.91 b
乙酸乙酯	9.63 ± 0.27 c	5.97 ± 1.32 b	26.65 ± 1.96 c
正丁醇	19.35 ± 0.71 d	13.19 ± 1.22 c	41.91 ± 2.71 d
水	24.79 ± 0.77 e	31.92 ± 3.05 d	63.68 ± 2.89 e

2.4 九里香粗提物不同极性溶剂萃取组分对晚疫病的防效

由表4可知, 九里香粗提物不同极性溶剂萃取组分对晚疫病均有一定的防效。石油醚和氯仿萃取组分防效较高, 其中石油醚萃取组分防效为100%。经比较, 分离后的石油醚萃取组分对晚疫病的防效显著高于分离前九里香粗提物的防效。

表4 九里香粗提物不同极性溶剂萃取组分对晚疫病的防效

植物名称	病情指数	防效/%
对照	92.27 ± 2.49 a	
石油醚	0.00 ± 0.00 f	100.00 ± 0.00 a
氯仿	7.46 ± 1.03 e	91.92 ± 2.44 b
乙酸乙酯	27.95 ± 1.59 d	69.71 ± 3.17 c
正丁醇	58.22 ± 2.71 c	36.90 ± 1.79 d
水	81.53 ± 3.02 b	11.64 ± 1.82 e

注: 处理浓度为50 mg/mL。

3 结论与讨论

本研究结果表明,5种南药植物粗提物对致病疫霉均有一定的抑菌活性,其中九里香粗提物抑菌活性最高;九里香粗提物各萃取组分中,石油醚萃取组分对致病疫霉抑菌活性较高;5种南药植物粗提物和九里香粗提物分离组分对致病疫霉休止孢萌发抑制作用强于对菌丝生长的抑制作用和对休止孢侵染离体叶片的活性;5种南药植物叶片乙醇提取物和九里香粗提物不同极性溶剂萃取的分离组分对晚疫病均有一定防效,其中九里香粗提物和九里香粗提物石油醚萃取组分防治效果较好,与粗提物和分离组分对致病疫霉的抑菌活性结果一致,因此九里香粗提物和九里香粗提物石油醚萃取组分展示出一定的应用前景。

筛选到植物粗提物和初分离组分具有较好的抑菌活性后,需分离并明确抑菌活性物质的化学成分。卢远倩等^[22]对九里香精油的组分进行了分离,鉴定出主要抑菌活性物质为n-棕榈酸等;骆焱平等^[23]对九里香层析物进行分离得到7-甲氧基-8-异戊烯基香豆素对香蕉炭疽等病原菌有较好抑菌活性。本研究有待进一步采用薄层层析、柱层析、气相色谱、液相色谱等方法分离活性成分,研究活性成分对致病疫霉的抑菌效果,并明确抗菌谱和作用机制,为将其作为先导化合物,进行仿生合成或结构改造,开发新型杀菌剂提供依据。

参考文献

- [1] GOODWIN S B, SPIELMAN L J, MATUSZAK J M. Clonal diversity and genetic differentiation of *Phytophthora infestans* populations in northern and central Mexico[J]. *Phytopathology*, 1992, 82(9): 955-961.
- [2] 李成斌,张红霞,李岩,等. 2015-2017年北方5省(区)致病疫霉抗性监测及与啞菌酯交互抗性[J]. *河北农业大学学报*, 2018, 41(6): 75-79.
- [3] 沈娟,徐炜枫,王云川,等. 小麦穗期主要使用药剂农药残留超标风险探析[J]. *现代农药*, 2015, 14(5): 42-43; 49.
- [4] 杨吉春,关爱莹,杨帆,等. 国内外杀菌剂进展[J]. *现代农药*, 2015, 14(5): 1-9; 17.
- [5] 胡同乐,王树桐,刘晓芸,等. 五倍子对致病疫霉抑制作用活性成分研究[J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(12): 6265-6266; 6370.
- [6] 王红刚,王文桥,韩秀英,等. 旋覆花提取物对致病疫霉抑制作用

- 初步研究 [C]//成卓敏. 植物保护与现代农业: 中国植物保护学会2007年学术年会论文集. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2007: 57-62.
- [7] 王树桐,曹克强,胡同乐,等. 知母提取物对马铃薯晚疫病病菌的抑制作用及防病效果[J]. *植物病理学报*, 2006(03): 267-272.
- [8] 肖伟,刘勇,肖培根. 大南药概念的重要意义[J]. *中国现代中药*, 2012, 14(3): 60-61.
- [9] 王兰英,骆焱平,卢远倩,等. 57种南药植物粗提物对螺旋粉虱杀虫活性初步研究[J]. *植物保护*, 2012, 38(1): 108-111.
- [10] 谢颖,雷霖霖,骆焱平. 6-酯基香豆素衍生物的除草抑菌活性[J]. *海南大学学报(自然科学版)*, 2014, 32(3): 233-238; 251.
- [11] 骆焱平,郑服丛,杨叶. 128种南药植物提取物对6种病原菌的生长抑制作用[J]. *热带作物学报*, 2004(4): 106-111.
- [12] 张应焰,尹彩萍. 15种中药提取物对几种植物病原菌抑菌活性的初步研究[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2005(增刊1): 175-177.
- [13] 古鑫,范志伟,沈奕德,等. 假臭草和九里香甲醇提取液对橡胶树白粉病菌抑菌活性的测定[J]. *热带作物学报*, 2012, 33(6): 1089-1095.
- [14] 林小苹. 九里香不同提取物对稻瘟病原菌的抑菌活性研究[J]. *福建农业科技*, 2017(4): 15-18.
- [15] 李花,张鹏,邢梦玉,等. 海南槲果藤叶提取物的抗氧化及抑菌活性研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2017, 29(11): 1910-1919; 1996.
- [16] 沈恬安,杨德友,骆焱平,等. 单叶蔓荆子提取物的抑菌活性[J]. *热带生物学报*, 2019, 10(3): 222-225.
- [17] 白丽莎,林江,王红星,等. 20种南药植物提取物的抑菌活性评价[J]. *贵州农业科学*, 2015, 43(8): 102-105.
- [18] 王红刚,王文桥,韩秀英,等. 旋覆花中1-氧-乙酰大花旋覆花内酯的分离分析及抑菌活性测定[J]. *植物保护学报*, 2008, 35(6): 551-556.
- [19] 毕秋艳,赵建江,韩秀英,等. 不同新型作用机制杀菌剂对梨树主要病菌毒力及防治流程应用[J]. *植物病理学报*, 2019, 49(4): 539-551.
- [20] 王文桥,王丽,韩秀英,等. 北方五省(区)马铃薯晚疫病病菌对甲霜灵和精甲霜灵的敏感性检测[J]. *植物保护*, 2012, 38(3): 116-121.
- [21] 兰杰,司乃国,李志念,等. SYP-14288与百菌清、代森锰锌生物活性的比较[J]. *农药*, 2012, 51(12): 927-928.
- [22] 卢远倩,王兰英,骆焱平. 九里香精油的抑菌活性及成分分析[J]. *农药*, 2011, 50(6): 443-445; 448.
- [23] 骆焱平,卢远倩,夏治琴,等. 九里香层析物的抑菌活性及成分分析[J]. *西北农业学报*, 2011, 20(9): 180-183.

(责任编辑:高蕾)