

大花金挖耳杀菌活性的进一步研究^{*}

李玉平^{1, 2}, 龚 宁¹, 江志利², 张 兴²

(1 西北农林科技大学 生命科学学院; 2 无公害农药研究服务中心, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 大花金挖耳(*Carpesium macrocephalum* Franch. et Sav)是菊科中杀菌活性较强的一种植物。研究进行了该植物全株及其根、茎、叶和花等5个部位6种溶剂的18种提取物对5种真菌的室内毒力测定。结果表明,大花金挖耳的活性成分主要集中在花中;大花金挖耳花的丙酮提取物对供试的小麦赤霉、苹果炭疽、玉米大斑、番茄灰霉和辣椒疫霉等5种病原菌菌丝生长的EC₅₀分别为3 280 34, 3 932 28, 100 97, 5 259 20和1 278 49 μg/mL;在系统提取中发现,大花金挖耳花的活性成分主要分布在乙酸乙酯和乙醇相中;温度对大花金挖耳活性成分的提取影响不大。大花金挖耳全株的丙酮提取物对黄瓜霜霉菌的保护作用和治疗作用均在50%以上。上述结果表明,大花金挖耳全株,尤其是花中含有高活性的抑菌成分。

[关键词] 大花金挖耳; 菊科; 活性成分; 杀菌活性

[中图分类号] S481+. 9

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)02-0035-04

大花金挖耳(*Carpesium macrocephalum* Franch. et Sav)属于菊科天明精属的植物,主要分布于我国东北、华北地区及陕西等地,生长于海拔1 000~2 000 m的山坡林缘、山谷等的灌丛中,民间用于治疗吐血^[1]。近年来,由于有机合成农药本身的属性及其在许多地区的不合理使用,造成了对非靶标生物的毒害和环境污染,并导致害物产生抗药性。因此,从植物资源中开发那些对害物高效、对人畜及其他非靶标生物安全、对环境质量影响较小的“生物合理农药”,成了当今农药开发的热点之一。早在1989年就有研究报道^[2],有1 389种植物有可能作为杀菌剂,因其中包含了许多不同类型的化合物。有学者对多种植物精油活性系统进行测试后发现,许多植物精油能抑制真菌的生长^[3]。孟昭礼等^[4]、吴恭谦等^[5]发现银杏叶、白头翁植株的提取液都有抑菌作用,杨征敏等^[6]、钮绪燕等^[7]、吴文君等^[8]分别对卫矛科、虎儿草科和楝科植物提取液的抑菌作用进行了较深入的研究。但目前尚未见有关菊科植物大花金挖耳的杀菌剂产品及其相关研究的报道,为此,本试验在前期试验的基础上^[9],对这种植物的杀菌活性进行了进一步的研究,对大花金挖耳的生物活性成分进行了平行提取和顺序提取,并用提取物对7种重要的农作物病原真菌进行了室内毒力测定及盆栽药效试验,试图为从大花金挖耳中寻找新一代杀菌先导化合物和创制新型杀菌剂奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 供试植物样品 大花金挖耳采自陕西(秦岭)蒿坪寺。经阴干后粉碎,过30目(494 μm)筛后于-30℃冰箱中保存备用。

1.1.2 供试菌种和盆栽植物 小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum* (Schw.) Petch), 苹果炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz et Sacc), 玉米大斑病菌(*Exserohilum turcicum* (Pass) Leonard & Suggs), 番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea* Pers Fr), 辣椒疫霉病菌(*Phytophthora capsici* Leon), 小麦白粉菌(*Erysiphe graminis* DC)和黄瓜霜霉菌(*Pseudoperonospora cubensis* Berk. et M. A. (Curtis) Rostovzev), 均由西北农林科技大学植物病理研究所提供。黄瓜(*Cucumis sativus* L., 长春密刺, 感霜霉病品种)市购。小麦(*Triticum aestivum* L., 陕225, 感白粉病品种)由西北农林科技大学农业科学院提供。

1.2 方 法

1.2.1 植物样品的化学提取方法 取粉碎的植物样品全株及根、茎、叶和花各适量,室温下以丙酮浸渍振荡提取3次,提取时间分别为3, 2, 1 d,将提取液合并减压浓缩,得到5种丙酮提取物,用丙酮定容并作空白对照以供生测;以同样的方法用石油醚

^{*} [收稿日期] 2003-03-03

[基金项目] 国家“十五”科技攻关项目(2002BA516A 04)

[作者简介] 李玉平(1970-),男,宁夏中宁人,讲师,在读博士,主要从事药用植物资源开发与利用研究。

(30~ 60 ℃)、乙酸乙酯、丙酮、乙醇、甲醇和水等 6 种溶剂对植物的花进行平行提取,得到 6 种提取物,采用各自溶剂分别定容和丙酮统一定容(其他 6 种溶剂浓缩后用丙酮定容)并作空白对照以供生测;将大花金挖耳花提取得到的浸膏,用以上 6 种极性由小到大的溶剂作为洗脱剂,把大花金挖耳花的提取浸膏 11.13 g 装入已湿法装柱的 3.0 cm×60 cm 硅胶柱,进行顺序分段洗脱并结合 TLC 与紫外分析,石油醚收集 500 mL,乙酸乙酯分 2 次各收集 500 mL,丙酮收集 500 mL,乙醇收集 500 mL,甲醇收集 500 mL,H₂O 相收集 500 mL,减压浓缩得到 7 种提取物,以各洗脱剂分别定容并作空白对照,药液浓度设为 0.01 g/mL 以供生测。

1.2.2 生物测定试验方法 供试样品对黄瓜霜霉菌(*C. cubensis* Berk. et M. A. (Curtis) Rostovtzev)和小麦白粉病菌(*G. graminis* DC)的抑菌活性采用盆栽试验法测定^[7,10];对小麦赤霉病菌(*G. graminis* Schw.) Petch)、番茄灰霉病菌(*B. circinea* Pers. Fr.)、辣椒疫霉病菌(*P. capsici* Leon)、苹果炭疽病菌(*G. gloeosporioides* (Penz.) Penz. et Sacc)和玉米大斑病菌(*T. turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs)的抑菌活性采用生长速率法和悬滴法^[11,12]测定。重复 3 次,取平均值。按下列公式进行生物测定效果评判:菌落直径(mm)=测量菌落直径平均值-4(菌饼直径),菌

丝生长抑制率=((对照菌落直径-处理菌落直径)/对照菌落直径)×100%;萌发率=(孢子萌发数/检查孢子总数)×100%,孢子萌发抑制率=((对照萌发率-处理萌发率)/对照萌发率)×100%;病情指数= $\sum((病级\times该病级的叶片数)/(最高病级\times总叶片数))\times100\%$,防治效果=((对照病情指数-处理病情指数)/对照病情指数)×100%。

2 结果与分析

2.1 大花金挖耳全株对黄瓜霜霉的防效

在大花金挖耳全株提取物对黄瓜霜霉的防效试验中,当药液浓度设为 0.05 g/mL 时,5~7 d 待对照发病后,调查病指。测得药液对黄瓜霜霉病的治疗作用和保护作用依次是 63.13% 和 84.16%。结合前期试验^[9]可知,这种植物在离体和活体生测中都表现出较强的杀菌活性。

2.2 大花金挖耳植株活性部位的筛选试验结果

对大花金挖耳不同部位的生物活性测试结果见表 1。从表 1 可以看出,将大花金挖耳对辣椒疫霉菌丝生长抑制作用的药液浓度设为 0.05 g/mL,对其他菌种药液浓度均设为 0.1 g/mL 时,大花金挖耳的主要活性成分在花中的分布最为集中。

表 1 大花金挖耳活性部位的离体生测

Table 1 The bioassay of the extracts of *C. macrocephalum* Franch et Sav's active parts

供试植物 样品部位 Part of tested plant	抑制率/% Inhibition									
	苹果炭疽 <i>C. gloeosporioides</i>		小麦赤霉 <i>G. graminis</i>		番茄灰霉 <i>B. circinea</i>		玉米大斑 <i>E. turcicum</i>		辣椒疫霉 <i>P. capsici</i>	
	①	②	①	②	①	②	①	②	①	②
花 Flower	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	-	-	100.00	100.00	67.03
根 Root	75.00	99.00	87.90	71.87	81.56	-	-	100.00	22.12	63.51
叶 Leaf	73.07	100.00	100.00	100.00	72.35	-	-	100.00	55.55	92.50
茎 Stem	55.77	90.00	91.94	46.86	41.56	-	-	100.00	10.12	44.64

注:①菌丝生长抑制率;②孢子萌发抑制率。

Note: ① Inhibition rate (%) of hypha; ② Inhibition rate (%) of spore germination

2.3 大花金挖耳花的提取物对 5 种真菌的毒力

从表 2 生测结果可见,大花金挖耳花的丙酮提取物对供试的 5 种病原真菌菌丝生长都有明显的抑制作用,提取物对供试的小麦赤霉、苹果炭疽、玉米

大斑、番茄灰霉、辣椒疫霉等 5 种病原真菌菌丝生长的 EC₅₀ 分别为 3.280 34, 3.932 28, 100.97, 5.259 20, 1.278 49 μg/mL。5 种病原真菌中,对大花金挖耳花的丙酮提取物最敏感的是玉米大斑菌。

表 2 大花金挖耳花的活性物质对菌丝生长抑制的毒力

Table 2 Toxicity to the growth of the hyphae

供试菌种 Pathogenic fungi	回归方程 Regression equation	卡方值 χ^2	EC ₅₀ (μg·mL ⁻¹)
小麦赤霉 <i>G. graminis</i>	$y = 5.3525x - 13.8189$	0.551 6	3.280 34
苹果炭疽 <i>C. gloeosporioides</i>	$y = 1.5514x - 0.5767$	3.261 4	3.932 28
玉米大斑 <i>E. turcicum</i>	$y = 0.6557x - 3.6858$	2.367 1	100.97
番茄灰霉 <i>B. circinea</i>	$y = 1.0706x + 1.0162$	2.159 6	5.259 20
辣椒疫霉 <i>P. capsici</i>	$y = 1.3167x + 0.9094$	1.212 4	1.278 49

2 4 大花金挖耳花活性成分的平行提取试验

从表 3 可以看出,所选溶剂中,乙酸乙酯、丙酮、乙醇、甲醇、水都能有效提出有效成分,但相对而言,丙酮、乙酸乙酯、乙醇作溶剂较好。考虑有效成分可

能包括极性成分和非极性成分,以及溶剂的价格、毒性等因素,选取丙酮和乙醇相结合作为大量提取所用溶剂。

表 3 大花金挖耳花不同溶剂提取物的生测结果

Table 3 The bioassay of the flowers of *Carpesium macrocephalum* Franch. et Sav extracts of different solvent against 6 fungi

溶剂 Solvent	菌丝生长抑制率/% Inhibition rate of hyphae					小麦白粉病防效/% Bio-activity	
	玉米大斑 <i>E. turcicum</i>	苹果炭疽 <i>C. gloeosporioides</i>	小麦赤霉 <i>G. gramin-earum</i>	辣椒疫霉 <i>P. capsici</i>	番茄灰霉 <i>B. circerea</i>	保护作用 Protective efficacy	治疗作用 Treatment efficacy
(1) 石油醚 Petroleum ether	60 07	59 62	58 13	48 17	43 03	28 43	26 27
(1) 乙酸乙酯 Ethyl acetate	100 00	100 00	100 00	100 00	100 00	75 33	26 27
(1) 丙酮 A cetone	100 00	100 00	100 00	100 00	100 00	50 23	38 46
(1) 乙醇 Ethyl alcohol	100 00	100 00	100 00	100 00	100 00	80 23	60 00
(1) 甲醇 M ethyl alcohol	100 00	100 00	100 00	100 00	100 00	47. 75	50 00
(1) 水 Water	80 00	74 19	69 03	65 16	70 43	40 13	10 00
(2) 石油醚 Petroleum ether	14 66	36 21	40 12	36 36	42 13	-	-
(2) 乙酸乙酯 Ethyl acetate	71 15	67. 67	100 00	100 00	100 00	-	-
(2) 丙酮 A cetone	90 29	80 17	100 00	100 00	100 00	-	-
(2) 乙醇 Ethyl alcohol	93 56	85 71	100 00	100 00	100 00	-	-
(2) 甲醇 M ethyl alcohol	73 56	78 44	100 00	100 00	100 00	-	-
(2) 水 Water	60 82	70 69	68 21	60 91	60 43	-	-

注: (1) 代表以各提取溶剂分别定容并作为对照,药液浓度定为 0.1 g/mL, 只在小麦白粉防效中,药液浓度为 0.0125 g/mL; (2) 代表各提取溶剂的提取物以丙酮定容并作为对照,药液浓度为 0.025 g/mL。

Note: (1) represents that every extract is respectively tested by its solvent acting as CK, the concentration is 0.1 g/mL, except the concentration of tested *Erysiphe graminis* DC is 0.0125 g/mL; (2) represents that every extract is respectively tested by acetone acting as CK, the concentration is 0.025 g/mL.

2 5 大花金挖耳花活性成分的提取温度

取大花金挖耳花 2 份,各 20 g, 分别在 25℃下用丙酮浸提 32 h 和在 80℃下索氏提取 8 h; 当浓度为 0.005 g/mL 时,80℃的提取物对苹果炭疽菌菌丝生长的抑制率为 61.05%,25℃的提取物为 58.37%; 当浓度为 0.025 g/mL 时,80℃的提取物使 5 种供试菌的菌丝生长均完全受到了抑制,而 25℃的提取物对苹果炭疽菌、玉米大斑菌菌丝的生长抑制率分别为 80.17% 和 90.29%, 对其他 3 种供试菌的菌丝生长抑制率均为 100%。可见,提取温度对大花金挖耳活性成分的影响不大,在某种程度上

80℃提取物还相对增强了对病原菌菌丝生长的抑制率。

2 6 大花金挖耳花活性成分的初步分离试验

从表 4 可以看出,有效成分主要集中在乙酸乙酯相、乙醇相和甲醇相中,说明至少有 2 组活性物质,即极性物质组和非极性物质组,经薄板层析(在氯仿展开下),在紫外灯下观察,发现在乙酸乙酯相中至少有 3 种化合物,其中极性较小的 1 种在紫外灯下呈红色荧光,乙醇相和甲醇相中成分较多而复杂,需进一步进行分离、检测。

表 4 6 种溶剂洗脱液对 5 种菌的菌丝生长抑制率

Table 4 The inhibition of 6 solvents extraction on hyphae of 5 kinds of pathogen fungi

溶剂 Solvent	菌种 Pathogenic fungi					%
	番茄灰霉 <i>B. circerea</i>	小麦赤霉 <i>G. zeae</i>	辣椒疫霉 <i>P. capsici</i>	苹果炭疽 <i>G. cinquulat</i>	玉米大斑 <i>E. turcicum</i>	
石油醚 Petroleum ether	0 00	0 00	3 01	0 00	10 25	
乙酸乙酯 I Ethyl acetate	100 00	100 00	100 00	100 00	100 00	
乙酸乙酯 II Ethyl acetate	76 77	80 46	70 35	80 25	64 28	
丙酮 A cetone	32 61	21. 74	0 00	22 58	0 00	
乙醇 Ethyl alcohol	100 00	100 00	100 00	100 00	100 00	
甲醇 M ethyl alcohol	100 00	100 00	58 03	79 31	23 79	
水 Water	40 36	21. 37	10 76	20 15	44 05	

3 讨 论

大花金挖耳在离体和活体条件下,对 7 种重要的农作物病原菌都有明显的杀菌活性,本研究在选取大花金挖耳花作为大量提取材料后,采用了石油醚(30~60 °C)、乙酸乙酯、丙酮、乙醇、甲醇、蒸馏水作为平行提取溶剂,并结合生测进行活性追踪,结果发现有效成分在乙酸乙酯、丙酮、乙醇、甲醇、蒸馏水中都有一定的溶解,相对来说在丙酮和乙醇中溶解的活性成分对供试病原菌的抑制率相对较高;同时发现,温度对大花金挖耳活性成分影响不大,故本

试验选丙酮和乙醇作为大量提取所用的溶剂,以防有效成分漏筛。

在活性成分的分离中,本研究根据前面平行提取所得各相的生测结果,对浸膏进行了极性由小到大的顺序洗脱,发现在石油醚中没有活性成分(或抑菌效果最差),相当于除去了没有活性的“杂质”,而在乙酸乙酯相和乙醇相中溶有活性极强的活性成分,结合 TLC 与紫外分析仪得知此二相中溶有不同的化学组分,是 2 组不同的杀菌成分混合物。今后应当对其中有效成分进一步研究,分析其结构并进行作用机理方面的探讨。

[参考文献]

- [1] 中国科学院西北植物研究所 秦岭植物志(第一卷 第五册)[M]. 北京: 科学出版社, 1985 210
- [2] 吴轶青. 使用天然抗菌化合物保护作物[J]. 农药译丛, 1996, 18(3): 9- 12
- [3] 方德秋, 肖顺元. 柠檬醛及香精油的抗菌研究概述[J]. 天然产物研究与开发, 1994, 6(2): 75- 78
- [4] 孟昭礼, 罗 兰. 人工模拟杀菌剂绿帝对八种病原菌的室内生测[J]. 莱阳农学院学报, 1998, 15(3): 159- 162
- [5] 吴恭谦. 三种毛茛植物提取物及原白头翁素的活性研究[J]. 安徽农学院学报, 1989, (1): 21- 31
- [6] 杨征敏, 钮绪燕, 吴文君. 卫矛科植物苦皮藤杀菌活性研究初报[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2002, 30(5): 74- 76
- [7] 钮绪燕, 吴文君, 刘虎歧, 等. 虎儿草科植物杀菌活性的初步研究[J]. 西北农业学报, 1993, 2(1): 83- 86
- [8] 吴文君, 刘惠霞, 朱靖博, 等. 天然产物杀虫剂——原理、方法、实践[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1997.
- [9] 李玉平, 慕小倩, 冯俊涛, 等. 几种菊科植物杀菌活性的初步研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2002, 30(1): 68- 72
- [10] 康振生, 商鸿生, 井金学, 等. 内吸杀菌剂烯唑醇对小麦条锈病和白粉病发育影响的研究[J]. 植物病理学报, 1996, 26(2): 111- 116
- [11] 陈年春. 农药生物测定技术[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1991.
- [12] 慕立义, 吴文君, 王开远. 植物化学保护研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1994 71- 85

A further study on the fungicidal activity of *Carpesium macrocephalum* Franch. et Sav

L I Yu-ping^{1,2}, GONG Ning¹, JIANG Zhi-li², ZHANG Xin²

(1 College of Life Sciences; 2 The Center of Biorational Pesticides Research and Development,
Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: *Carpesium macrocephalum* Franch. et Sav is one species of Compositae with strong fungicidal function. The bioassay of 18 extracts from 5 parts of this plant against 5 fungus species has been carried out in 2000- 2002. The results showed that the acetonic extracts of the plant had more than 50% protective and treatment efficacy to the *Pseudoperonospora cubensis* Berk. et M. A. (Curtis) Rostovzev; The fungicidal constituents from *C. macrocephalum* Franch. et Sav are mainly found in flower; The acetonic extracts from the flower of *C. macrocephalum* Franch. et Sav were able to inhibit the hypha growth of *Fusarium graminearum* (Schw.) Petch, *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz et Sacc, *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard and Suggs, *Botrytis cinerea* Pers Fr. and *Phytophthora capsici* Leon. The EC₅₀ were 3 280 34, 3 932 28, 100 97, 5 259 20 and 1 278 49 μg/mL respectively. Extraction was made by organic solvent of petroleum ether, acetic ether, acetone, alcohol, methanol and H₂O respectively. The acetic ether and alcohol extracts from the flower of *C. macrocephalum* Franch. et Sav were more effective than that of other organic solvent.

Key words: *Carpesium macrocephalum* Franch. et Sav; compositae; active-compounds; fungicidal activity