

骆驼蓬醇提物抑菌活性的初步研究

张义英^a, 王俊儒^a, 龚月桦^b, 张 锋^a, 张瀚文^b

(西北农林科技大学, a 理学院; b 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 采用抑制菌丝生长法和毒力测定法, 研究了骆驼蓬地上部醇提物的石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇和水5个极性部位对南瓜枯萎病菌(*Fusarium bulbigenum*)、西瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. *niveum*)、辣椒疫霉病菌(*Phytophthora capsici*)、苹果腐烂病菌(*Valsa mali*)和番茄早疫病菌(*Alternaria solani*)等5种常见植物病原菌的抑制作用。结果表明, 氯仿部分、乙酸乙酯部分和正丁醇部分对供试植物病原菌均有抑制作用。其中氯仿部分的抑菌效果较好, 当质量浓度为15 mg/mL时, 其对5种植物病原菌的抑制率均在83%以上; 15 mg/mL乙酸乙酯部分和正丁醇部分分别对番茄早疫病菌和苹果腐烂病菌有强烈且稳定的抑制作用, 抑制率达100.00%, 正丁醇部分对这两种菌丝生长抑制毒力最好, EC_{50} 分别为0.090和0.279 mg/mL。

[关键词] 骆驼蓬; 极性部位; 植物病原真菌; 抑菌活性

[中图分类号] Q949.752.6; S482.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2006)11-0121-04

骆驼蓬(*Peganum harmala* L.)为蒺藜科骆驼蓬属植物, 在我国内蒙古、宁夏、新疆等西北地区广泛生长, 资源丰富。目前, 有关骆驼蓬的抗肿瘤、杀虫活性的研究报道较多, 骆驼蓬粗提物具有抗肿瘤、镇痛、消炎、抗氧化酶等多方面的生物活性^[1-4], 并且粗提物对蚊虫、萝卜蚜、植食性害螨及小麦蚜虫均表现出良好的杀虫活性^[5-7], 对植物锈菌、白粉菌(*Erysiphe*)、黑粉菌(*Ustilago*)等病原菌及细菌有较强抑制活性^[8-9]; 骆驼蓬籽油对绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)等细菌有抑制作用^[9-10], 尤其对金黄色葡萄球菌作用显著; 其醇提取物对小麦条锈菌(*Puccinia striiformis* West)、玫瑰锈菌(*Puccinia rosae-rugosae* Kasai)、小麦白粉菌(*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*)、苹果褐斑菌(*Helmintosporium carpsorum*)等植物病原菌孢子的校正抑制率达80%以上^[8], 这些研究结果表明, 骆驼蓬是一种很有应用潜力的药源植物。

番茄早疫病菌(*Alternaria solani*)、辣椒疫霉病菌(*Phytophthora capsici*)和苹果腐烂病菌(*Valsa mali*)等植物病原菌在蔬菜、果树上普遍发生。目前防治这些植物病原菌的主要杀菌剂为化学杀菌剂。

但是长期使用单一的化学杀菌剂, 不仅造成病原菌对化学杀菌剂产生抗药性而降低农药的效果, 而且会对环境造成污染, 对公众的健康也会造成危害。目前, 化学杀菌剂在许多国家已被限制或禁止使用。而植物是生物活性化合物的天然宝库, 被认为是取代化学合成杀菌剂最好的资源^[11]。因此, 研究高效低毒的植物源农药已成为当今新型杀菌剂创新研究的热点之一^[12-13]。

目前, 还未见骆驼蓬不同极性部位对南瓜枯萎病菌、西瓜枯萎病菌、辣椒疫霉病菌、苹果腐烂病菌和番茄早疫病菌等蔬菜、水果常见病原菌抑制作用的研究报道。因此, 本试验探讨骆驼蓬醇提物的5个极性部位对这5种常见植物病原菌的抑制作用, 以为其作为植物源农药的研发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

骆驼蓬: 2003-05 采自新疆维吾尔自治区昌吉州境内的干旱地带, 经陕西杨凌西北农林科技大学常朝阳副研究员鉴定为骆驼蓬(*Peganum harmala* L.), 将其地上部分(含种子)自然风干、粉碎, 备用。

菌种: 番茄早疫病菌(*Alternaria solani*)、辣椒

· [收稿日期] 2006-05-22

[基金项目] 教育部留学回国基金项目“骆驼蓬地上部分及其生物活性研究”(2004101012); 西北农林科技大学2005年度青年学术骨干支持计划项目

[作者简介] 张义英(1980-), 女, 山东济南人, 硕士, 现在长春医学高等专科学校药系工作, 主要从事植物资源化学研究。

E-mail: hengxinn@163.com

[通讯作者] 王俊儒(1966-), 男, 陕西杨凌人, 教授, 博士, 主要从事植物资源化学和环境生物学研究。E-mail: wangjr07@163.com

疫霉病菌 (*Phytohthora capsici*)、南瓜枯萎病菌 (*Fusarium bulbigenum*)、西瓜枯萎病菌 (*F. oxysporum f. niveum*) 和苹果腐烂病菌 (*Valsa mali*) 5 种病原菌均由陕西杨凌西北农林科技大学无公害农药研究服务中心提供。

试剂: 石油醚、氯仿、乙酸乙酯、乙醇、正丁醇等试剂均为分析纯, 由陕西国药集团代购。

1.2 方法

1.2.1 骆驼蓬地上部醇提物不同极性部位的制备

在室温下, 用体积分数 95% 乙醇将样品浸泡 5 次, 每次 7 d, 提取液在 40 °C 下减压蒸馏, 回收溶剂, 得乙醇浸膏。将乙醇浸膏悬浮于蒸馏水, 先后用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇和蒸馏水萃取, 分别得石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇和水 5 部分萃取物, 同前浓缩, 即得各极性部位, 萃取率依次为 4.6%, 1.7%, 0.3%, 4.8%, 7.6%, 备用。

1.2.2 骆驼蓬地上部醇提物不同极性部位抑菌活性的测定 不同极性部位抑菌活性测定采用抑制菌丝生长速率法^[14]。以体积分数 50% 丙酮水为溶剂, 配制待测样品溶液。把一定浓度的待测样品溶液和 50% 丙酮水(对照) 1 mL 加到 9 mL 的 PDA 培养基中混合均匀, 倒入经高温灭菌的培养皿中, 配制成含药液质量浓度分别为 5, 10, 15 mg/mL 的培养基。用直径为 7 mm 的打孔器在活化好的各病原菌培养基上打孔取菌饼。菌丝一面朝上置于各个药液不同浓

度梯度的 PDA 培养基中, 28 °C 恒温条件下培养 3~4 d, 根据对照生长情况, 用十字交叉法测量菌落直径。每个处理设 3 个重复, 取 3 次重复平均值为测定结果。按下式计算药效。

菌落生长直径/mm = 菌落直径平均数 - 7 mm

抑制率/% = (对照生长直径 - 处理生长直径) / 对照生长直径 × 100%

1.2.3 毒力测定^[14] 以体积分数 50% 丙酮水作为溶剂, 将 1.2.2 中抑菌活性较好的极性部位配成不同浓度梯度, 按 1.2.2 的方法测定各浓度下的菌落直径, 计算抑制率。将抑制率转换为几率值, 浓度转换为对数形式, 以浓度对数 (x) 为横坐标, 抑制率的几率值 (Y) 为纵坐标, 作毒力曲线, 得毒力方程和 EC_{50} 值。

1.2.4 数据处理 用 SAS 软件(美国 SAS 公司, 版本 8.0)对试验数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 骆驼蓬地上部醇提物不同极性部位抑菌活性的筛选

对骆驼蓬地上部醇提物不同极性部位抑菌活性的测定结果见表 1。从表 1 可以看出, 骆驼蓬醇提物的不同极性部位对 5 种植物病原菌的影响作用不同, 并存在一定的差异, 而且同一极性部分对不同种植物病原菌的抑制效果也不同。

表 1 骆驼蓬地上部醇提物不同极性部位对 5 种植物病原菌的抑制作用 (84 h)

Table 1 Inhibition effect of the different polar fractions in the alcoholic extracts from the aboveground of *Peganum harmala* L. on 5 types of pathogenic fungi (84 h)

供试药液/ (mg · mL ⁻¹) Concentration of samples		抑制率/% Inhibition rate				
		南瓜枯萎病菌 <i>Fusarium ulbigenum</i>	西瓜枯萎病菌 <i>Foxy sp orum f. niveum</i>	辣椒疫霉病菌 <i>Phytohthora capsici</i>	苹果腐烂病菌* <i>Valsa mali</i>	番茄早疫病菌 <i>A lternaria solani</i>
氯仿部分	5	48.56 d	51.22 e	57.61 d	80.00 d	66.67 c
Chloroform	10	74.04 b	82.58 c	81.49 b	98.50 ab	100.00 a
fraction	15	83.06 a	91.67 b	88.24 a	99.20 a	100.00 a
正丁醇部分	5	40.52 e	41.46 f	43.69 e	93.87 b	63.33 c
n-Butanol	10	49.47 d	55.68 de	62.30 d	100.00 a	84.01 b
fraction	15	54.59 d	58.75 d	63.14 d	100.00 a	100.00 a
乙酸乙酯部分	5	30.03 f	34.63 gh	35.92 f	54.19 e	38.24 e
Ethyl acetate	10	51.58 d	50.00 e	59.90 dc	87.27 c	48.00 e
fraction	15	65.41 c	100.00 a	75.29 c	100.00 a	100.00 a
石油醚部分	5	22.99 f	18.00 i	19.09 hi	14.84 h	17.65 f
Petroleum	10	29.82 f	29.83 f	21.85 h	31.09 g	44.00 e
ether	15	37.30 e	37.50 fg	28.04 g	43.73 f	57.58 dc
fraction	5	0	0	15.53 i	4.52 i	14.71 f
蒸馏水部分	10	0	0	6.08 j	0	0
Water	15	0	0	5.88 j	0	* *
fraction						

注: “*” 为作用 72 h 测定值; “***” 表示对菌体生长有促进作用; 同列数据后标不同字母者表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: “*” the data were the values after 72 h. “***” means the promotional effects, respectively. The letters mean significant differences at $P < 0.05$.

氯仿部分、乙酸乙酯部分和正丁醇部分对 5 种植物病原菌均表现为抑制作用(图1), 且抑制率基本上随药液质量浓度的增加而提高。水部分仅对个别病原菌有微弱抑制作用。当质量浓度相同时, 与其他极性部位相比, 氯仿部分对 5 种植物病原菌均有较高的抑菌活性, 在质量浓度为 15 mg/mL 时, 其对 5 种植物病原菌菌丝的抑制率均高于 83%, 其中对番茄早疫病菌、西瓜枯萎病菌和苹果腐烂病菌的抑制率分别为100 00%, 91 67%和99 20%; 当质量浓度为 10 mg/mL 时, 其对苹果腐烂病菌和番茄早疫病菌的抑制率仍达98 50%和100 00%。正丁醇部分对

苹果腐烂病菌和番茄早疫病菌抑制作用较强, 当质量浓度为 15 mg/mL 时, 其对番茄早疫病菌和苹果腐烂病菌菌丝生长抑制率均为 100 00%; 而在质量浓度 10 mg/mL 时, 其对苹果腐烂病菌的抑制率达 100 00%; 15 mg/mL 乙酸乙酯部分对西瓜枯萎病菌、苹果腐烂病菌(图2)及番茄早疫病菌的抑制率均达 100 00%。石油醚部分对所供试 5 种植物病原菌的抑制作用相对微弱, 抑制率显著低于氯仿部分、乙酸乙酯部分和正丁醇部分。水部分对辣椒疫霉病菌有微弱的抑制作用, 但对番茄早疫病菌菌丝生长有促进作用。

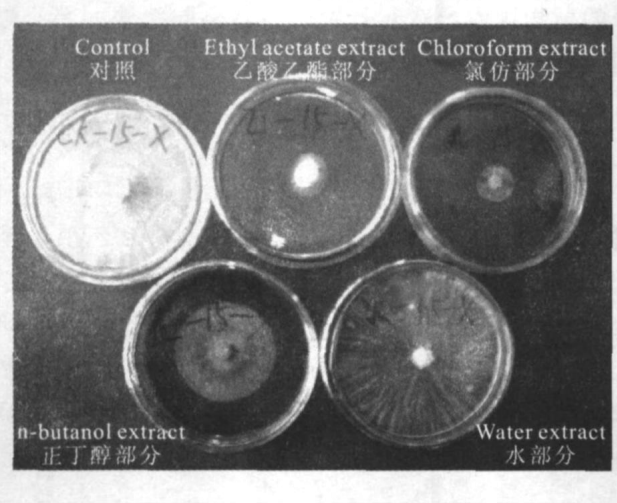


图 1 骆驼蓬地上部醇提取物不同极性部位 (15 mg/mL) 对西瓜枯萎病菌的作用
Fig 1 Inhibition effect of the different polar fractions (15 mg/mL) in the alcoholic extract from the aboveground of *Peganum hamala* L. on *Foxysporum f niveum*

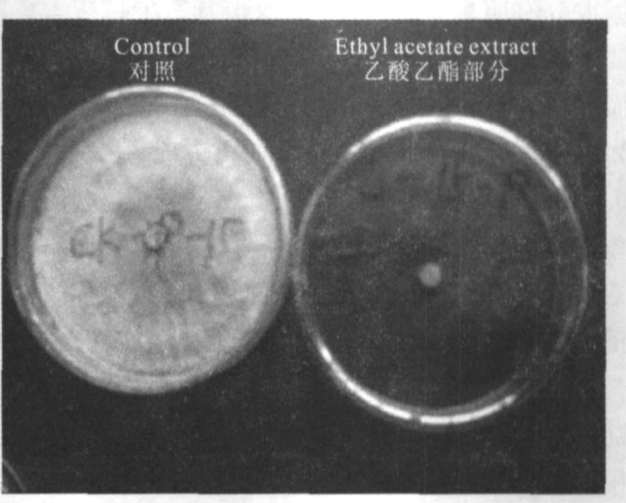


图 2 骆驼蓬地上部醇提取物乙酸乙酯部分 (15 mg/mL) 对苹果腐烂病菌的作用
Fig 2 Inhibition effect of the ethylacetate fraction in the alcoholic extracts from the aboveground of *Peganum hamala* L. on *Valsa mali*

2 2 骆驼蓬地上部醇提取物3 个不同极性部位对2 种植物病原菌的毒力测定结果
氯仿部分、正丁醇部分和乙酸乙酯部分对苹果

腐烂病菌和番茄早疫病菌的抑制活性较好, 所以测定这 3 个极性部位对这 2 种植物病原菌菌丝生长抑制的毒力, 结果见表 2 和表 3。

表 2 骆驼蓬地上部醇提取物 3 个极性部位对苹果腐烂病菌菌丝生长抑制的毒力测定结果

Table 2 Virulence of 3 kinds of polar fractions in the alcoholic extract from the aboveground of *Peganum hamala* L. on *Valsa mali*

供试药液 Extract	毒力方程 Virulence equation	相关系数(r) Correlation coefficient (r)	EC ₅₀ / (mg · mL ⁻¹)
氯仿部分 Chloroform fraction	Y= 1 764 5x+ 5 182 4	0 922 0	0 788
正丁醇部分 n-Butanol fraction	Y= 0 856 1x+ 5 894 0	0 989 8	0 090
乙酸乙酯部分 Exthyl acetate fraction	Y= 1 102 7x+ 4 710 3	0 922 6	1 831

由表2 和表3 可知, 正丁醇部分对苹果腐烂病菌和番茄早疫病菌菌丝生长的抑制毒力均最高, EC₅₀ 分别为0 090 和0 279 mg/mL, 其次是氯仿部分, 对

这两种病原菌的 EC₅₀ 分别为 0 788 和0 475 mg/mL。

表3 骆驼蓬地上部醇提取物3个极性部位对番茄早疫病菌丝生长抑制的毒力测定结果

Table 3 Virulence of 3 kinds of polar fractions in the alcoholic extract from the aboveground of *Peganum hamala* L. on *A lternaria solani*

供试药液 Fraction	毒力方程 Virulence equation	相关系数(r) Correlation coefficient (r)	$EC_{50}/(mg \cdot mL^{-1})$
氯仿部分 Chloroform fraction	$Y = 0.4095x + 5.1324$	0.9634	0.475
正丁醇部分 n-Butanol fraction	$Y = 0.7396x + 5.4106$	0.9760	0.279
乙酸乙酯部分 Ethyl acetate fraction	$Y = 0.5985x + 4.3372$	0.9705	12.808

3 讨 论

本研究结果表明, 骆驼蓬醇提取物5个极性部位的中强极性部位均含有抑菌活性物质, 对5种植物病原菌有一定的抑制作用。由于不同极性部位中化学成分有明显差异, 不同植物病原菌生长所需要的要素和代谢方式不同, 所以其活性也有所差异。整体而言, 氯仿部分对5种病原菌的抑制效果较好, 对苹果腐烂病菌和番茄早疫病病菌的 EC_{50} 分别为0.788和0.475 mg/mL; 15 mg/mL 乙酸乙酯部分对西瓜枯萎病菌、苹果腐烂病菌及番茄早疫病病菌的抑制率均达100.00%; 15 mg/mL 正丁醇部分对苹果腐烂病菌和番茄早疫病病菌抑制率均达100.00%, EC_{50} 分别为0.090和0.279 mg/mL。由此可见, 骆驼蓬对番茄早疫病病菌和苹果腐烂病菌不但有很强的抑制作用, 而且药效持续时间长, 因此其抑菌活性值得研究。

从本试验结果可以看出, 骆驼蓬活性物质主要集中在中强极性部位, 这可能与生物碱、萜类、黄酮甙体等抑菌活性物质有关^[12]。骆驼蓬的药理活性成分主要为生物碱, 开花期地上部分的生物碱总量高达5.77%^[15], 并且资源丰富, 因此其可作为一种较好的植物源农药进行开发研究。骆驼蓬地上部乙醇提取物水部分对番茄早疫病菌丝生长有促进作用, 可能是因为它含有糖、氨基酸等营养物质从而促进了菌体生长。因此, 骆驼蓬作为药用资源具有较强的开发价值, 但骆驼蓬抑菌活性具体成分尚不明确, 应对抑菌效果好的氯仿部分、正丁醇部分和乙酸乙酯部分进行分离纯化, 以期得到抑菌活性较高的化学成分, 并对其抑菌作用方式、作用机理作进一步研究。各种供试药液对不同植物病原菌的生长有抑制作用, 这可为寻找广谱性或者单一抑制植物病原真菌的植物源活性成分提供一定依据。

致谢: 本试验中的供试菌种由西北农林科技大学无公害农药研究服务中心张兴教授等提供, 在此表示感谢!

[参考文献]

- [1] 潘启超, 杨小平, 李春杰, 等. 骆驼蓬总碱药理作用的研究[J]. 中山医科大学学报, 1997, 18(3): 165-167.
- [2] 段金廛, 周汉荣. 中国蒺藜科药用植物的研究现状与展望[J]. 中草药, 1993, 24(6): 320-326.
- [3] 陈蔚如, 张海丽, 张 岩. 骆驼蓬生物碱的抗炎、镇痛、止痒作用[J]. 中国药理学通讯, 2000, 17(4): 25-26.
- [4] Chen Q, Chao R, Chen H, et al. Antitumor and neurotoxic effects of novel hamaine derivatives and structure-activity relationship analysis[J]. Int J Cancer, 2005, 114(5): 675-682.
- [5] 马安勤, 钟国华. 骆驼蓬等植物提取物杀虫活性研究[J]. 华南农业大学学报, 2003, 24(1): 38-41.
- [6] 赵国林, 姜双林, 薛林贵, 等. 骆驼蓬初提物对植食性害虫的药效实验初报[J]. 西北农业大学学报, 1997, 25(4): 111-114.
- [7] 姚伟琴, 王俊儒, 张普照, 等. 骆驼蓬粗提物杀虫活性初步研究[J]. 西北植物学报, 2004, 24(6): 1096-1099.
- [8] 姜双林, 赵国林. 骆驼蓬提取物对8种植物病原真菌的抑菌研究[J]. 西北农业大学学报, 1998, 7(6): 81-83.
- [9] Prashanth D, John S. Antibacterial activity of *Peganum hamala*[J]. Fitoterapia, 1999, 70(4): 438-439.
- [10] 米克热木·沙布扎提, 阿海提·托伦别克, 余佳琳. 复方骆驼蓬子油体外抑菌作用观察[J]. 新疆农业科学, 1997(4): 189.
- [11] 操海群, 岳永德, 彭镇华, 等. 汤锋毛竹提取物的抑菌活性及其有效成分的初步分离[J]. 植物病理学报, 2005, 35(5): 428-433.
- [12] 吴传万, 杜小凤, 王伟中, 等. 植物源抑菌活性成分研究新进展[J]. 西北农业学报, 2004, 13(3): 81-88.
- [13] 薛林贵, 赵国林, 王毅民. 多裂骆驼蓬的杀虫抑菌研究[J]. 微生物学通报, 2005, 32(1): 48-51.
- [14] 吴文君. 植物化学保护实验技术导论[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1987.
- [15] 王长虹, 刘 军, 郑立明, 等. 不同产地骆驼蓬不同药用部位中生物碱的含量分析[J]. 中国药理学杂志, 2002, 37(3): 211-215.

(下转第128页)

- [9] 吴国娟, 张中文, 李焕荣, 等. 中草药对奶牛乳房炎6种致病菌的抑菌效果观察[J]. 北京农学院学报, 2003, 18(3): 195-198
- [10] 童延清, 李 晖. 紫花地丁、蒲公英体外抗菌作用[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2003, 23(9): 669
- [11] 肖崇厚. 中药化学[M]. 上海: 上海科学出版社, 1997: 289-290

Antibacterial constituent of *Viola yedoensis* Makino

ZHANG Wu-gang^a, LI Ding-gang^b, SONG Yu-min^b, ZHOU Le^a, JIN Ya-ping^b

(^a College of Life Sciences, ^b College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Antibacterial activity of *Viola yedoensis* Makino and its antibacterial constituents were studied in this paper against *S. aureas*, *S. agalactiae*, *S. uberis*, *S. dysagalactiae*, *E. coli* and *Salmonella* *in vitro*. One antibacterial constituent (compound 1) from the chloroform extract was obtained with tracing-antibacterial activity method. The results showed that compound 1 was preliminarily identified as flavone; that main antibacterial constituents in *V. yedoensis* Makino existed in chloroform phase and ethanol-water (1:1) phase, that minimal inhibitory concentrations (MIC) of compound 1 were 0.039, 0.078, 0.156, 0.313, 0.625 and 1.25 mg/mL respectively against *S. dysagalactiae*, *S. aureas*, *E. coli*, *S. agalactiae*, *S. uberis* and *Salmonella*, and minimal bactericidal concentrations (MBC) were ≤ 2.5 mg/mL against *S. aureas*, *S. agalactiae* and *S. uberis*, and > 2.5 mg/mL against *S. dysagalactiae*, *E. coli* and *Salmonella*.

Key words: *Viola yedoensis* Makino; antibacterial activity; antibacterial constituent; tracing-antibacterial activity; isolation and purification

(上接第124页)

Abstract ID: 1671-9387(2006)11-0121-CA

Antifungal activity of ethanol extracts from *Peganum harmala* L.

ZHANG Yi-yang^a, WANG Jun-ru^a, GONG Yue-hua^b, ZHANG Feng^a, ZHANG Han-wen^b

(^a College of Science, ^b College of Life Sciences, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The hypha growth-inhibiting method and the virulence determination method were used to investigate the inhibition effects of the petroleum ether fraction, chloroform fraction, ethyl acetate fraction, n-butanol fraction and water fraction in the alcoholic extracts from the aboveground of *Peganum harmala* L. on the five types of popular plant pathogenic fungi, *Alternaria solani*, *Phytophthora capsici*, *Fusarium bulbigenum*, *Fusarium oxysporum f. niveum* and *Valsa mali*. The results showed that chloroform fraction, n-butanol fraction, and ethylacetate fraction can inhibit the growth of five types of popular plant pathogenic fungi. The inhibition effect of chloroform fraction was the most potent, with the inhibition rate about more than 83% to 5 plant pathogenic fungi under the concentration of 15 mg/mL. Under the concentration of 15 mg/mL, the ethyl acetate fraction and n-butanol fraction thoroughly inhibited the growth of *Alternaria solani* and *Valsa mali*, with the inhibition rate up to 100%. The n-butanol fraction showed the highest potent virulence, with EC_{50} to *Alternaria solani* and *Valsa mali* about 0.09 and 0.279 mg/mL respectively.

Key words: *Peganum harmala* L.; polar fraction; plant pathogenic fungi; antifungal activity