

文章编号: 1674-7054(2014)04-0334-05

红毛丹果壳中齐墩果烷型三萜苷类成分的生防活性

马青云¹, 黄圣卓¹, 戴好富¹, 梅文莉¹, 莫明和², 赵友兴¹

(1. 中国热带农业科学院 热带生物技术研究所/农业部热带作物生物学与遗传资源利用重点实验室/海南省黎药资源天然产物研究与利用重点实验室, 海南 海口 571101; 2. 云南大学 生物资源保护与利用重点实验室, 云南 昆明 650091)

摘要: 研究了红毛丹果壳中的9个齐墩果烷型三萜苷类化合物对线虫(*Panagrellus redivivus*)、烟草青枯病菌(*Ralstonia solanacearum*)、棉花枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*)和香蕉枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*)的生防活性,并分析了齐墩果烷型三萜苷拮抗病原菌的构效关系。研究表明,9个齐墩果烷型三萜苷对线虫(*Panagrellus redivivus*)均有一定的致死活性,部分化合物对烟草青枯病菌(*Ralstonia solanacearum*)、棉花枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*)和香蕉枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*)显示拮抗作用,其中有4个齐墩果烷型三萜苷对这4种植物病原菌表现出兼拮抗性。

关键词: 红毛丹; 齐墩果烷型三萜苷; 生防活性

中图分类号: S 459

文献标志码: A

使用安全高效的生物农药是控制病虫害的有效措施。植物源天然产物是创新农药研制的宝贵资源库,从植物中发掘生防活性天然产物(先导化合物)并开发成安全有效的农药已是病虫害防治的重要研究领域。近年来植物源单体天然产物杀虫剂和杀菌剂的研究已取得较大进展,发现的抗菌和杀虫活性成分类型包括生物碱、糖苷类、萜烯类、类黄酮、有机酸和酚类等^[1]。一些化合物如菊酯、鱼藤酮、印楝素^[2]和烟碱等已开发成市售杀虫剂,另以植物次生代谢产物活性成分为先导化合物开发的杀菌剂有乙蒜素、稻瘟灵、恶霉灵等^[3]。植物源天然产物抗菌杀虫活性也常有报道,如 β -石竹烯和 α -蒎烯对棉蚜具有忌避作用^[4],7,13-松香二烯-3-酮对黏虫幼虫显示拒食活性并具有对菜青虫的毒杀活性^[5],糖脂类天然产物具有杀线虫和抑制烟草青枯病菌的活性^[6]。红毛丹 *Nephelium lappaceum* L. 为无患子科韶子属热带水果^[7],原产于南亚,其果实气味清新、外形独特,常作为收敛剂治疗严重的痢疾,或作解热剂和驱风剂^[8]。在马来西亚,红毛丹的干果壳可入药^[9],但在我国红毛丹的果壳常被作为废弃物。目前,红毛丹果壳中的化学成分仅发现数量有限的酚类化合物^[9-10]。笔者前期对红毛丹果壳中化学成分进行了分离鉴定,发现其含有齐墩果烷型三萜苷^[11-12]和类黄酮成分^[13]。为检验其对植物病原菌的生防活性,笔者研究了红毛丹果壳中分离鉴定的9个齐墩果烷型三萜苷类化合物对线虫(*Panagrellus redivivus*)、烟草青枯病菌(*Ralstonia solanacearum*)、棉花枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*)和香蕉枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*)的生防活性,旨在为红毛丹废弃资源的创新利用提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料 全齿复活线虫(*Panagrellus redivivus*)、烟草青枯病菌(*Ralstonia solanacearum*)、棉花枯萎

收稿日期: 2014-07-07

基金项目: 国家科技支撑计划课题(2013BAI11B04); 海南省重大科技项目课题(ZDX2013008-4); 中央级公益性科研院所基本科研业务费(ITBB110301; ITBB140401)

作者简介: 马青云(1978-),女,硕士,助理研究员。研究方向: 植物活性成分。E-mail: maqingyun@itbb.org.cn

通信作者: 赵友兴(1974-),男,博士,研究员。研究方向: 活性天然产物化学。E-mail: zhaoyouxing@itbb.org.cn;

莫明和(1970-),男,博士,教授。研究方向: 生物资源保护利用。E-mail: minghemo@163.com

病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*) 和香蕉枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) 均由云南大学生物资源保护与利用重点实验室提供。拮抗活性测试的化合物为由中国热带农业科学院热带生物技术研究所分离得到的红毛丹果壳单体化合物 9 个齐墩果烷型三萜苷类成分^[11-12] (见图 1)。9 个齐墩果烷型三萜苷类(以下简称化合物) 为:

- 1: hederagenin 3-O-(3-O-acetyl- β -D-xylopyranosyl) (1 $\rightarrow$ 3) - α -L-arabinopyranoside;
- 2: hederagenin 3-O-(α -L-rhamnopyranosyl) (1 $\rightarrow$ 2) - α -L-arabinopyranoside;
- 3: hederagenin 3-O-(4-O-acetyl- α -L-arabinopyranosyl) (1 $\rightarrow$ 3) - α -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2) - α -L-arabinopyranoside;
- 4: hederagenin 3-O-(3-O-acetyl- β -D-xylopyranoside) (1 $\rightarrow$ 3) - α -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2) - α -L-arabinopyranoside;
- 5: hederagenin 3-O-(α -L-arabinopyranosyl) (1 $\rightarrow$ 3) - α -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2) - α -L-arabinopyranoside;
- 6: hederagenin 3-O-(β -D-glucopyranosyl) (1 $\rightarrow$ 3) - α -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 4) - β -D-xylopyranoside;
- 7: hederagenin 3-O-(2,3-di-O-acetyl- α -L-arabinofuranosyl) (1 $\rightarrow$ 3) - α -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2) - β -L-arabinopyranoside;
- 8: hederagenin 3-O-(3-O-acetyl- α -L-arabinofuranosyl) (1 $\rightarrow$ 3) [α -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)] - β -L-arabinopyranoside;
- 9: hederagenin 3-O-(α -L-arabinofuranosyl) (1 $\rightarrow$ 3) [α -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)] - β -L-arabinopyranoside.

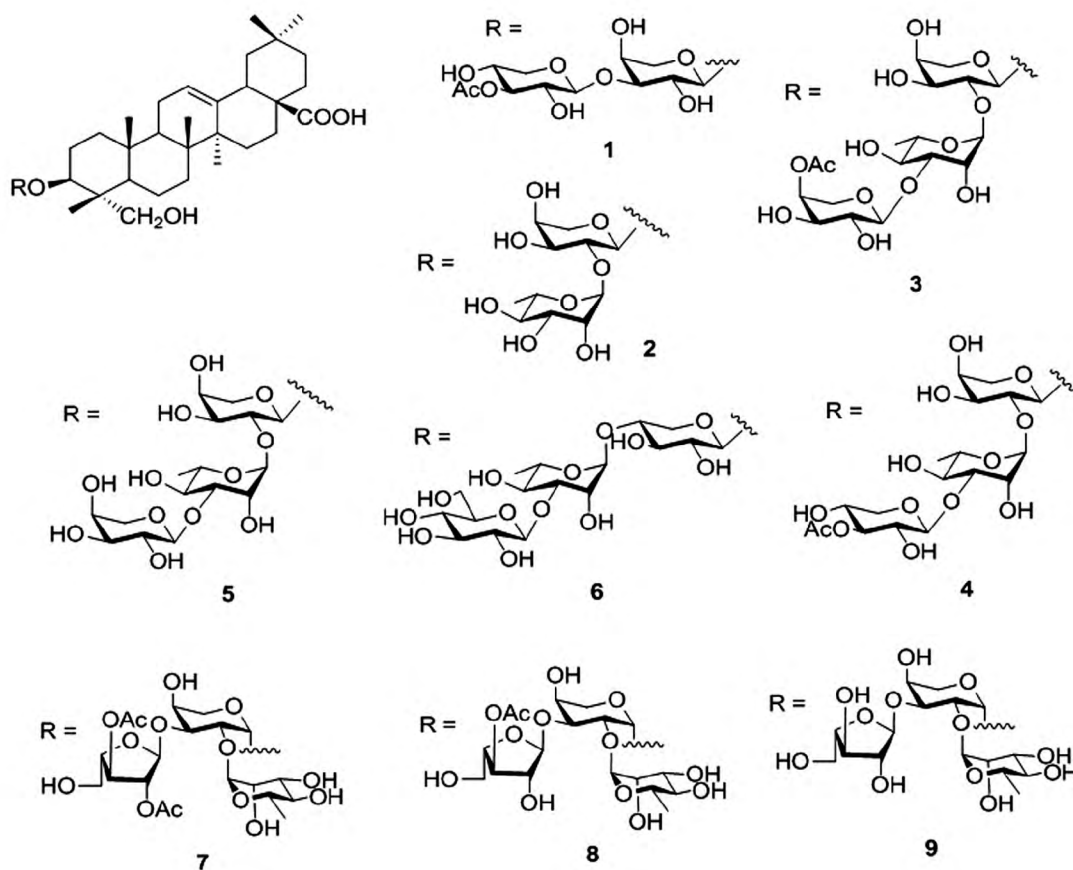


图 1 红毛丹果壳中 9 个齐墩果烷型三萜苷化合物结构

Fig. 1 Structures of 9 oleanane saponins from the rind of *Nephelium lappaceum*

1.2 实验方法

1.2.1 样品对线虫的致死活性 全齿复活线虫用燕麦片培养基(燕麦片 20 g,水 60 mL,混匀后分装于 250 mL 锥形瓶中,121 ℃ 灭菌 30 min) 于 28 ℃ 下培养 7~10 d。按贝曼漏斗法用无菌水在 4 层擦镜纸上

过滤线虫 2 次,获得线虫悬液。样品悬液制备:将 1.0 mg 样品用 20 μL 二甲基亚砜(DMSO)溶解制成样品溶液。测定杀线虫活性时,在 96 孔板的每孔中加 30 μL 线虫悬液(约 150 条),无菌水 65 μL ,样品悬液 5 μL ,样品终浓度为 2.5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。用等量的 DMSO 替代样品溶液作为对照,每处理 3 次重复。96 孔板在室温下混匀后于室温下培养 24 h,在解剖镜下观察计数线虫死亡数,并根据以下公式计算死亡率,统计的线虫数量不少于 100 条。

$$\text{线虫死亡率} = \text{死亡线虫数} / \text{计数线虫总数} \times 100\%;$$

$$\text{线虫校正死亡率} = (\text{处理线虫死亡率} - \text{对照线虫死亡率}) / (1 - \text{对照线虫死亡率})。$$

1.2.2 样品对烟草青枯病菌的拮抗活性 烟草青枯病菌用牛肉膏固体培养基活化,用其液体培养基培养病原菌备用(约 $1 \times 10^7 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$)。刚灭菌的固体牛肉膏培养基冷却至 50 ~ 60 $^{\circ}\text{C}$,在每 330 mL 培养基中加 100 μL 烟草青枯病菌培养液,充分摇匀倒平板,待培养基凝固后在平板上滴加 5 μL 待测样品(样品终浓度为 2.5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)或对照溶剂(二甲亚砜,DMSO),每处理 3 次重复。将上述处理平板于 30 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 2 d,用抑菌圈直径大小表示样品对烟草青枯病菌的拮抗活性。

1.2.3 样品对棉花枯萎病菌和香蕉枯萎病菌的拮抗活性 棉花枯萎病菌和香蕉枯萎病菌均用含青霉素和氯霉素的双抗 PDA 固体培养基培养。取 1.6 μL 样品溶液(含化合物 80 μg)点加到 PDA 平板上,每个平板点接 3 个重复,呈等腰三角形;在三角形的中央接种直径 0.5 cm 的棉花枯萎病菌和香蕉枯萎病菌菌株,对照用等量的 DMSO 替代样品溶液。将上述处理平板于 28 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 3 ~ 4 d,测量并计算抑菌率。

$$\text{菌丝生长抑菌率} = \text{对照菌落直径} - \text{处理菌落直径} / \text{对照菌落直径} \times 100\%$$

$$\text{菌丝生长校正抑菌率} = (\text{处理抑菌率} - \text{对照抑菌率}) / (1 - \text{对照抑菌率})$$

2 结果与分析

2.1 齐墩果烷型三萜苷对线虫的致死活性 9 个齐墩果烷型三萜苷对全齿复活线虫的致死活性结果(见表 1)显示,9 个齐墩果烷型三萜苷对线虫均具有一定的致死活性,其校正致死率在 18.7% ~ 62.1%。化合物 3 和 6 显示了相对较强的致死活性,校正致死率超过了 50%;化合物 5 和 9 则表现出较弱的致死活性,其校正致死率均低于 20%。

2.2 齐墩果烷型三萜苷对烟草青枯病菌的拮抗作用 9 个齐墩果烷型三萜苷对烟草青枯病菌的拮抗活性结果(见表 1)显示,6 个齐墩果烷型三萜苷类成分(1, 3, 4, 7, 8, 9)对烟草青枯病菌有一定的抑制作用,其抑菌圈直径在 3.42 ~ 5.83 mm。化合物 3, 4 和 8 显示了相对较强的抑制活性,抑菌圈直径超过了 4 mm,而化合物 2, 5 和 6 则未表现出抑制活性。

2.3 齐墩果烷型三萜苷对香蕉枯萎病菌的拮抗作用 9 个齐墩果烷型三萜苷对香蕉枯萎病菌的拮抗活性结果(见表 1)显示,5 个齐墩果烷型三萜苷类成分(3, 4, 6, 7, 8)对香蕉枯萎病菌的生长显示较弱的抑制作用,其菌丝生长校正抑菌率在 16.3% ~ 28.8% 范围,均低于 30%。化合物 1, 2, 5 和 9 则对香蕉枯萎病菌的生长无明显影响,未表现出抑制活性。

2.4 齐墩果烷型三萜苷类对棉花枯萎病菌的拮抗作用 化合物对棉花枯萎病菌的拮抗活性结果(见表 1)显示,7 个齐墩果烷型三萜苷类成分(2 ~ 8)对棉花枯萎病菌的生长显示一定的抑制作用,其菌丝生长校正抑菌率在 19.6% ~ 39.5% 范围。化合物 3, 5 和 6 显示了相对较强的抑制活性,校正抑菌率超过了 30%。化合物 1 和 9 则对棉花枯萎病菌的生长未表现抑制活性。

2.5 齐墩果烷型三萜苷拮抗病原菌的构效分析 本实验所用的 9 个齐墩果烷型三萜苷类化合物的苷元均为常春藤苷元,所含的糖单元有 4 种:葡萄糖、鼠李糖、阿拉伯糖和木糖。化合物 1 和 2 含有 2 个糖配基,化合物 3 ~ 9 均含有 3 个糖配基。从 9 个齐墩果烷型三萜苷对 4 种植物病原菌的生防活性总体结果(见表 1)来看,含有 3 个糖配基的三萜苷活性要略强于含有 2 个糖配基的活性;4 个化合物(3, 4, 7, 8)对 4 种植物病原菌显示兼抗活性;对于相同糖配基的三萜苷类成分 3 ~ 5 和 7 ~ 9,糖配基连有乙酰基的化合物的生防活性要强于未连乙酰基的化合物,且乙酰基的数量越多,则活性表现越强,这表明齐墩果烷型三萜苷类化合物中乙酰基基团是生防活性较重要的活性基团。

表 1 红毛丹果壳中齐墩果烷型三萜苷对病原菌的拮抗活性

Tab. 1 Biocontrol activity of oleanane saponins from the rind of *Nephelium lappaceum* against pathogens

化合物 Compounds	线虫校正致死率 / % Panagrellus redivivus (calibrated death rate / %)	烟草青枯病菌 (抑菌圈直径 / mm) <i>Ralstonia solanacearum</i> (inhibitory zone diameter / mm)	香蕉枯萎病菌 (校正抑菌率 / %) <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> (calibrated inhibitory rate / %)	棉花枯萎病菌 (校正抑菌率 / %) <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> (calibrated inhibitory rate / %)
1	34.6 ± 4.9	3.85 ± 0.51	—	—
2	29.9 ± 3.5	—	—	19.6 ± 4.1
3	57.3 ± 4.3	5.83 ± 0.67	17.7 ± 3.3	46.9 ± 5.5
4	26.8 ± 3.7	4.56 ± 0.45	16.3 ± 2.8	27.2 ± 4.3
5	18.7 ± 3.2	—	—	39.5 ± 4.8
6	62.1 ± 5.6	—	15.2 ± 2.5	34.7 ± 3.7
7	35.2 ± 4.7	3.97 ± 0.42	28.8 ± 3.6	25.1 ± 4.2
8	31.8 ± 4.2	4.25 ± 0.53	21.3 ± 3.1	20.9 ± 3.5
9	19.4 ± 2.8	3.42 ± 0.39	—	—

注 “—”表示无活性
Noted “—” means inactive

3 讨 论

寻找生物源天然生防活性成分成为创新绿色农药研发的重要手段,已成为植物保护研究领域的热点之一。齐墩果烷型三萜苷类成分是具有多种药理活性的一大类天然产物,包括抗肿瘤^[4-13]、生物酶抑制(如脂肪酸合酶 FAS、环氧化酶 COX 和脂氧合酶 LOX)^[11-14]以及灭螺活性^[17]。笔者首次对红毛丹果壳中分离得到的齐墩果烷型三萜苷类化合物进行 4 种植物病原菌生防活性研究,发现 9 个化合物对线虫均有一定的致死活性,6 个化合物对烟草青枯病菌具有拮抗作用,7 个化合物对棉花枯萎病菌表现拮抗作用,5 个化合物对香蕉枯萎病菌显示了拮抗作用,有 4 个化合物对这 4 种病原菌表现出兼抗活性,并对齐墩果烷型三萜苷类化合物生防活性进行构效分析,为该类成分合成更强活性的衍生物提供理论参考。红毛丹为热带地区重要的水果资源,其废弃物果壳资源丰富,挖掘热带水果副产物中生防活性成分来研发绿色创新农药,可实现热带水果副产物高值化创新利用。

参考文献:

[1] 贾明慧,张辉,张爱华,等. 植物次生代谢产物在国内农药开发方面的研究进展 [J]. 中国植保导刊,2012,32(3):15-18.

[2] 谭卫红,宋湛谦. 天然植物杀虫剂印楝素的研究进展 [J]. 华南热带农业大学学报,2004,10(1):23-28.

[3] 刘雨晴,薛明,张庆臣,等. 黄荆中 β -石竹烯对棉蚜的毒力和作用机理 [J]. 昆虫学报,2010,53(4):396-404.

[4] 闫海燕,冯瑞红,陈利标,等. 砂地柏中 6 种萜烯类化合物分离鉴定及其杀虫活性研究 [J]. 西北植物学报,2007,27(1):163-167.

[5] 马青云,黄圣卓,李红芳,等. 杠板归中化学成分生防活性研究 [J]. 湖北农业科学,2013,52(21):5245-5247.

[6] WALL M M. Ascorbic acid and mineral composition of longan (*Dimocarpus longan*), lychee (*Litchi chinensis*) and rambutan (*Nephelium lappaceum*) cultivars grown in Hawaii [J]. J. Food Compos. Anal., 2006, 19: 655-663.

[7] RAGASA C Y, DE LUNA R D, CRUZ W C, et al. Monoterpene lactones from the seeds of *Nephelium lappaceum* [J]. J. Nat. Prod., 2005, 68(9):1394-1396.

[8] PALANISAMY U, MING C H, MASILAMANI T, et al. Rind of the rambutan, *Nephelium lappaceum*, a potential source of natural antioxidants [J]. J. Food Chem., 2008, 109(1):54-63.

[9] THITILERTDECHA N, TEERAWUTGULRAG A, KILBURN J D, et al. Identification of major phenolic compounds from *Nephelium lappaceum* L. and their antioxidant activities [J]. Molecules, 2006, 15(3):1453-1465.

- [0] THITILERTDECHA N, TEERAWUTGULRAG A, RAKARIYATHAM N. Antioxidant and antibacterial activities of *Nephelium lappaceum* L. extracts [J]. LWT-Food Sci. Technol., 2008, 41 (10): 2029–2035.
- [1] ZHAO Y X, LIANG W J, FAN H J, et al. Fatty acid synthase inhibitors from the hulls of *Nephelium lappaceum* L. [J]. Carbohydrate Res., 2011, 346 (11): 1302–1306.
- [2] LIANG W J, MA Q Y, JIANG H Z, et al. A new hederagenin glycoside from *Nephelium lappaceum* [J]. Chem. Nat. Comp., 2012, 47 (6): 935–939.
- [3] 梁文娟, 马青云, 蒋合众, 等. 红毛丹果壳的化学成分 [J]. 中草药, 2011, 42(7): 1271–1275.
- [4] TIAN J K, XU L Z, ZOU Z M, et al. Three novel triterpenoid saponins from *Lysimachia capillipes* and their cytotoxic activities [J]. Chem. Pharm. Bull., 2006, 54 (4): 567–569.
- [5] TIAN J K, XU L Z, ZOU Z M, et al. New antitumor triterpene saponin from *Lysimachia capillipes* [J]. Chem. Nat. Comp., 2006, 42 (3): 328–331.
- [6] SHEN Y H, WENG Z Y, ZHAO Q S, et al. Five new triterpene glycosides from *Lysimachia foenum-graecum* and evaluation of their effect on the arachidonic acid metabolizing enzyme [J]. Planta Med., 2005, 71 (8): 770–775.
- [7] KOHDA H, TAKEDA O, TANAKA S. Molluscicidal triterpenoidal saponin from *Lysimachia sikoliana* [J]. Chem. Pharm. Bull., 1989, 37 (12): 3304–3305.

Biocontrol Activity of Oleanane Saponins from the Rind of *Nephelium lappaceum*

MA Qingyun¹, HUANG Shengzhuo¹, DAI Haofu¹, MEI Wenli¹, MO Minghe², ZHAO Youxing¹

(1. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences /Ministry of Agriculture Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Tropical Crops /Hainan Key Laboratory for Research and Development of Natural Products from Li Folk Medicine, Haiko 571101, China; 2. Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resources, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Abstract: Nine oleanane saponins were isolated from the rind of the rambutan (*Nephelium lappaceum*) to determine their biocontrol activities against *Panagrellus redivivus*, *Ralstonia solanacearum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, and the effect of the structures of these 9 compounds on the three pathogens was also analyzed. The 9 compounds were found to exhibit lethal activity against *P. redivivus*, and some compounds showed antagonism against *R. solanacearum*, *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* and *F. oxysporum* f. sp. *cubense*. Four compounds displayed their antagonism against all the tested pathogens. The compound structure analysis showed that the compounds with the acetyl group linked to the sugar moiety were better in antagonistic action against the pathogens than those with no acetyl group linked to the sugar moiety, indicating the acetyl group in the structure of oleanane saponins is an important active group in biocontrol activity.

Key words: *Nephelium lappaceum*; oleanane saponins; biocontrol activity