

文章编号: 1674-7054(2016)01-0092-07

柱花草次级代谢产物的分离鉴定及其抑菌活性

刘文超^{1,3}, 刘寿柏², 梅文莉², 戴好富², 蒋昌顺³

(1. 海南大学 农学院, 海口 570228; 2. 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, 海口 570101; 3. 中国热带农业科学院 环境与植物保护研究所, 海口 570101)

摘要: 为探索高抗炭疽病型 Mineriao 柱花草(*Stylosanthes guianensis* ‘Mineriao’) 的抗炭疽菌活性成分, 笔者从 Mineriao 柱花草叶片的乙醇提取物中共分离鉴定出 8 个化合物, 经波谱解析与文献数据对照鉴定其 8 个化合物的结构为水杨酸, 美迪紫檀素, aglycone of crotonionoside F, schensiand A, 松脂醇, 3'-methoxycoumestrol, stigmast-5-ene-3 β , 7 α -diol 和亚油酸甘油酯。8 个化合物均为首次从柱花草叶片中分离得到。抗菌活性结果表明: 水杨酸对胶孢炭疽菌(*Collectotrichum gloeosporioides* (Pent.) Sacc.)、香蕉枯萎镰刀菌 4 号生理小种(*F. oxysporum* f. sp. cuben)、棉花枯萎镰刀菌(*F. oxysporum* f. sp. vasinfectum) 和棉花黄萎菌(*Verticillium dahlia* Kleb) 有抑制作用; 美迪紫檀素对胶孢炭疽菌、棉花黄萎菌有抑制作用; 亚油酸甘油酯对胶孢炭疽菌有抑制作用。

关键词: Mineriao 柱花草; 炭疽病; 化学成分; 抗菌活性

中图分类号: Q 946.887 **文献标志码:** A **DOI:** 10.15886/j.cnki.rdswwb.2016.01.016

柱花草(*Stylosanthes* spp.) 是一种优良的热带豆科(Leguminosae) 牧草, 占世界热带、南亚热带地区人工草地牧草品种的三分之一, 也是我国热带地区最重要的热带牧草, 并形成了“北有苜蓿草, 南有柱花草”的草业发展格局^[1], 但柱花草炭疽病(*Stylo anthracnose*) 使牧草产量和种子产量锐减甚至绝收, 成为柱花草的毁灭性病害。目前, 柱花草抗炭疽病的研究主要集中在育种^[2-10] 和药剂防治方面^[11], 仅见柱花草自身代谢产物抗炭疽病的研究报道, 尚未见柱花草次级代谢产物抗炭疽病的研究报道。付海天等对抗病柱花草和感病柱花草的初级代谢产物蛋白质进行了探索, 结果发现可溶性蛋白质对炭疽菌不具有抑制作用, 不溶性蛋白质对炭疽菌的作用无法确定; 在 PAL, PPO, SOD 3 种酶活性方面, 在炭疽菌作用下, 抗病 Mineriao 柱花草(*Stylosanthes guianensis* ‘Mineriao’) 的酶活性先升后降, 感病 CIAT2312 柱花草的酶活性则起伏不定^[12]。Mineriao 柱花草对炭疽病具有高抗性^[13], 因此, 探索其次级代谢产物对胶孢炭疽菌的抑制作用具有重要意义。笔者采用硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱等手段对 Mineriao 柱花草叶片的次级代谢产物进行分离纯化及结构鉴定, 并对分离得到的化合物进行抑菌活性测试, 为 Mineriao 柱花草的高抗炭疽病性与其叶片中次级代谢产物的相关联系提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试剂 柱层析用硅胶(60~80 目, 200~300 目) 和薄层层析硅胶板(青岛海洋化工厂); 有机试剂为重蒸甲醇、乙酸乙酯、氯仿、石油醚和 95% 乙醇; Methanol-d₄ 99.8 atom % D [西格玛奥利奇(上海)贸易有限公司], Dimethyl sulfoxide-d₆ 99.9 atom % D, contains 0.03% (v/v) TMS [西格玛奥利奇(上海)贸易有限公司], CHLOROFORM-D (D, 99.8%) + 0.03% (v/v) TMS (Tenglong Weibo technology); Seph-

收稿日期: 2015-11-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(柱花草 MSRA 基因的抗炭疽病功能分析, 31271783)

作者简介: 刘文超(1989-), 男, 海南大学农学院 2013 级硕士研究生. E-mail: 343951892@qq.com

通信作者: 蒋昌顺(1967-), 男, 理学博士, 研究员, 研究方向: 分子生物学. E-mail: changshunj@aliyun.com

adex LH-20 (德国 Merck 公司); 反相材料 RP-18 (德国 Merck 公司); MCI GEL CHP20P (75 ~ 150 μ) (MITSUBISHI CHEMICAL CORPPRATION); 80% 多菌灵可湿性粉剂(河北益海安格诺农化有限公司)。

1.2 植物材料 Mineriao 柱花草叶片采自海南省儋州市中国热带农业科学院热带牧草研究中心试验基地。

1.3 病原菌 来源于柱花草的 8 号胶孢炭疽菌(*Collectotrichum gloeosporioides* (Pent.) Sacc.) 由中国热带农业科学院环境与植物保护研究所易克贤研究员提供; 香蕉枯萎镰刀菌 4 号生理小种(*F. oxysporum* f. sp. cuben)、棉花枯萎镰刀菌(*F. oxysporum* f. sp. vasinfectum)、棉花黄萎菌(*Verticillium dahlia* Kleb) 由中国热带农业科学院热带生物技术研究所曾会才研究员提供。

1.4 仪器与设备 Brucker AV-500 型超导核磁共振仪(TMS 内标, 瑞士 Bruker 公司); amaZon SL 质谱仪(瑞士 Bruker 公司); PP221S 型电子天平(北京赛多利斯天平有限公司); JCS-6A 型电子天平(上海友声衡器有限公司); DL-400 型循环冷凝器(郑州长城科工贸有限公司); SB-1100 型立体旋式蒸发仪(上海爱郎仪器有限公司); CA-1111 型冷却水循环系统(上海爱郎仪器有限公司); R-2002 型旋转蒸发仪(巩义市予华仪器有限公司)。

1.5 提取 取 Mineriao 柱花草叶片(5.0 kg) 并风干, 用 95% 乙醇(用量为 20 L·次) 浸提 3 次, 每次提取 7 d。乙醇提取液减压浓缩至无醇味, 分散于水中成悬浊液, 依次用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取 3 次, 分别减压浓缩得浸膏。

1.6 分离纯化 将乙酸乙酯萃取物(47.6 g) 用 MCI 柱除色素后采用硅胶(硅胶 H) 减压柱色谱, 以氯仿: 甲醇 = 1: 0 ~ 0: 1 梯度洗脱, 分段收集得到 4 个流分(Fr. 1 ~ Fr. 4)。Fr. 1 (8.1 g) 经加压 ODS (甲醇: 水 = 3: 1 ~ 1: 0) 梯度洗脱, 得 18 个流分(Fr. 1-1 ~ Fr. 1-18)。经反复 Sephadex LH-20(氯仿: 甲醇 = 1: 1) 柱色谱以及加压硅胶柱色谱得到化合物 1 (85.0 mg)、化合物 2 (43.0 mg)、化合物 3 (2.5 mg)。

将石油醚萃取物(138.2 g) 用 MCI 柱除色素后采用加压 ODS (甲醇: 水 = 3: 1 ~ 1: 0) 梯度洗脱, 得到 5 个流分(Fr. 1' ~ Fr. 5')。Fr. 1' (19.8 g) 经反复 Sephadex LH-20(氯仿: 甲醇 = 1: 1) 柱色谱以及加压硅胶柱色谱得到化合物 4 (5.0 mg)、化合物 5 (8.0 mg)、化合物 6 (40.0 mg)、化合物 7 (20.0 mg)、化合物 8 (14.0 mg)。

1.7 波谱处理 将 8 个化合物送至中国热带农业科学院热带生物技术研究所核磁共振室打谱, 通过 Me-stReNova 软件对谱图进行处理, 根据碳谱出峰情况初步确定碳原子数及其位置; 根据 dept 谱来识别 CH_2 ; 根据 HSQC 谱确定 C, H 之间的对应关系; 根据氢谱出峰位置和积分值来进一步确定 C, H 对应关系; 根据 HMBC 谱确定 C, H 远程之间的关系; 根据 $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY 谱确定相邻 H, H 之间的关系; 根据 ROESY 谱确定 H, H 之间的空间关系, 从而确定化合物的化学结构。

1.8 抗菌活性检测 采用滤纸片琼脂扩散法^[2]测定化合物 1 ~ 8 抗胶孢炭疽菌活性检测及化合物 1, 2, 5, 6 抗其他 3 种农业病原的抗菌活性。将胶孢炭疽菌(*Collectotrichum gloeosporioides* (Pent.) Sacc.)、香蕉枯萎菌(*F. oxysporum* f. sp. cuben)、棉花枯萎菌(*F. oxysporum* f. sp. vasinfectum) 和棉花黄萎菌(*Verticillium dahlia* Kleb) 分别制成一定浓度的菌悬液($1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ cfu $\cdot$ mL⁻¹), 用涂抹棒将其均匀涂布在供试无菌培养皿中, 制成含菌平板。将分离得到的化合物分别配成浓度为 20.0 g $\cdot$ L⁻¹ 的样品溶液, 选用直径为 6.0 mm 的灭菌滤纸片, 分别加样品溶液 25 μ L, 待溶剂挥发干后, 将已经点样的滤纸片贴于已涂供试菌悬液的琼脂培养基上, 放置 20 min 后, 再放入培养箱 28 $^{\circ}\text{C}$ 无光照条件培养, 每 12 h 观察 1 次, 有明显抑菌圈后测其抑菌圈直径(D)。每处理重复 3 次。以 10 μ L 浓度为 10.0 g $\cdot$ L⁻¹ 的多菌灵为阳性对照, 通过比较抑菌圈直径大小确定抗菌活性。

2 结果与分析

2.1 结构鉴定 化合物 1: 无色结晶, 分子式 $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$, ESI-MS m/z : 139 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 $^1\text{H} - \text{NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ : 6.82 (1H, t, $J = 7.6$ Hz, H-5), 6.86 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-1), 7.39 (1H, ddd, $J = 1.8, 7.2, 8.8$ Hz, H-4), 7.80 (1H, dd, $J = 1.6, 7.9$ Hz, H-6); $^{13}\text{C} - \text{NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) δ : 118.1 (C-1), 163.1 (C-2), 113.8 (C-3), 136.5 (C-4), 120.0 (C-5), 131.5 (C-6), 173.5 (C-7)。以上波谱数据与文献 [3] 报道的基本一致, 经过 2D 图谱核对鉴定为水杨酸。

化合物 2: 红色油状, 分子式 $C_{16}H_{14}O_4$, ESI-MS m/z : 293 $[M + Na]^+$. 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 3.53 (1H, m, H-6a), 3.62 (1H, t, $J = 11.0$ Hz, H_β -6), 4.24 (1H, dd, $J = 5.0, 11.0$ Hz, H_α -6), 5.50 (1H, d, $J = 6.7$ Hz, H-11a), 6.41 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-4), 6.46 (1H, dd, $J = 2.1, 6.7$ Hz, H-8), 6.46 (1H, d, $J = 4.6$ Hz, H-10), 6.54 (1H, dd, $J = 2.5, 8.4$ Hz, H-2), 7.13 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-7), 7.38 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-1); ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 55.7 (9-OCH₃), 132.3 (C-1), 110.0 (C-2), 157.2 (C-3), 103.8 (C-4), 156.7 (C-4a), 66.6 (C-6), 39.6 (C-6a), 119.3 (C-6b), 124.9 (C-7), 97.1 (C-8), 161.2 (C-9), 106.6 (C-10), 160.7 (C-10a), 78.7 (C-11a), 112.7 (C-11b)。上述波谱数据与文献 [4] 报道的基本一致,故鉴定为美迪紫檀素 (Medicarpin)。

化合物 3: 无色粉末, 分子式 $C_{13}H_{24}O_2$, ESI-MS m/z : 235 $[M + Na]^+$. 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 0.83 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H-13), 0.86 (3H, s, H-11), 0.87 (1H, ddd, $J = 11.9, 11.9, 11.9$ Hz, H-4b), 0.91 (3H, s, H-12), 1.08 (1H, dd, $J = 11.9, 11.9$ Hz, H-2b), 1.22 (3H, d, $J = 5.9$ Hz, H-10), 1.53 (1H, m, H-5), 1.68 (1H, ddd, $J = 2.8, 4.1, 12.4$ Hz, H-2a), 1.96 (1H, m, H-4a), 3.72 (1H, m, H-3), 4.21 (1H, m, H-9), 5.29 (1H, dd, $J = 9.8, 15.4$ Hz, H-7), 5.45 (1H, dd, $J = 6.3, 15.4$ Hz, H-8); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 35.9 (C-1), 51.2 (C-2), 67.4 (C-3), 45.6 (C-4), 32.2 (C-5), 58.6 (C-6), 131.2 (C-7), 138.5 (C-8), 69.4 (C-9), 24.0 (C-10), 21.7 (C-11), 31.9 (C-12), 21.7 (C-13)。以上波谱数据与文献 [5] 报道的基本一致,故鉴定为 aglycone of crotonionoside F。

化合物 4: 无色油状, 分子式 $C_{15}H_{26}O_3$, ESI-MS m/z : 277 $[M + Na]^+$. 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 1.15 (3H, s, H-12), 1.15 (3H, s, H-13), 1.16 (3H, s, H-15), 1.22 (3H, s, H-14), 1.72 (2H, m, H-9), 1.78 (2H, m, H-8), 2.23 (2H, t, $J = 6.1$ Hz, H-4), 3.67 (1H, t, $J = 6.7$ Hz, H-10), 5.02 (1H, dd, $J = 1.6, 10.7$ Hz, H-1 cis), 5.18 (1H, dd, $J = 1.6, 17.3$ Hz, H-1 trans), 5.47 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-6), 5.59 (1H, dt, $J = 15.6, 6.1$ Hz, H-5), 5.91 (1H, dd, $J = 10.7, 17.3$ Hz, H-2); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 112.0 (C-1), 146.2 (C-2), 73.7 (C-3), 46.3 (C-4), 124.0 (C-5), 140.9 (C-6), 84.2 (C-7), 39.2 (C-8), 27.4 (C-9), 86.6 (C-10), 73.7 (C-11), 25.9 (C-12), 25.8 (C-13), 26.3 (C-14), 27.0 (C-15)。以上波谱数据与文献 [6] 报道的基本一致,故鉴定为 schensiand A。

化合物 5: 无色结晶, 分子式 $C_{20}H_{22}O_6$, ESI-MS m/z : 381 $[M + Na]^+$. 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 3.10 (2H, m, H-8, 8'), 3.88 (2H, m, H-9a, 9'a), 3.92 (6H, s, 3, 3'-OCH₃), 4.24 (2H, m, H-9b, 9'b), 4.74 (2H, d, $J = 4.4$ Hz, H-7, 7'), 6.82 (2H, dd, $J = 8.1, 1.9$ Hz, H-6, 6'), 6.88 (2H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5, 5'), 6.90 (2H, brs, H-2, 2'); ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 133.0 (C-1, C-1'), 108.7 (C-2, C-2'), 145.4 (C-3, C-3'), 146.8 (C-4, C-4'), 114.4 (C-5, C-5'), 119.1 (C-6, C-6'), 86.0 (C-7, C-7'), 54.3 (C-8, C-8'), 71.8 (C-9, C-9'), 56.1 (3, 3'-OCH₃)。以上波谱数据与文献 [7] 报道的基本一致,故鉴定为松脂醇 (Pinoresinol)。

化合物 6: 无色结晶, 分子式 $C_{16}H_{10}O_6$, ESI-MS m/z : 321 $[M + Na]^+$. 1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 6.90 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-4), 6.93 (1H, dd, $J = 8.1, 1.8$ Hz, H-2), 7.24 (1H, s, H-10), 7.31 (1H, s, H-7), 7.84 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-1), 9.68 (1H, s, OH), 10.74 (1H, s, OH); ^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 122.7 (C-1), 113.8 (C-2), 161.1 (C-3), 103.1 (C-4), 154.5 (C-4a), 157.8 (C-6), 102.5 (C-6a), 113.9 (C-6b), 101.9 (C-7), 147.0 (C-8), 146.8 (C-9), 99.2 (C-10), 149.5 (C-10a), 159.3 (C-11a), 104.4 (C-11b), 56.2 (8-OCH₃)。以上波谱数据与文献 [8] 报道的基本一致,故鉴定为 3'-methoxycoumestrol。

化合物 7: 无色结晶, 分子式 $C_{29}H_{50}O_2$, ESI-MS m/z : 453 $[M + Na]^+$. 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 0.68 (3H, s, H-18), 0.82 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-27), 0.84 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-26), 0.86 (3H, t, $J = 7.6$ Hz, H-29), 0.92 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-21), 0.99 (3H, s, H-19), 3.58

(H, m, H-3), 3.85 (1H, brs, H-7), 5.59 (1H, dd, $J = 2.1, 5.8$ Hz, H-6); ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 37.1 (C-1), 31.4 (C-2), 71.5 (C-3), 42.1 (C-4), 146.4 (C-5), 123.9 (C-6), 65.5 (C-7), 37.6 (C-8), 42.4 (C-9), 37.5 (C-10), 20.8 (C-11), 39.3 (C-12), 42.3 (C-13), 49.5 (C-14), 24.4 (C-15), 28.4 (C-16), 55.8 (C-17), 11.8 (C-18), 18.4 (C-19), 36.2 (C-20), 18.9 (C-21), 34.0 (C-22), 26.0 (C-23), 46.0 (C-24), 29.3 (C-25), 19.9 (C-26), 19.2 (C-27), 23.2 (C-28), 12.1 (C-29)。以上波谱数据与文献 [9] 报道的基本一致,故鉴定为 stigmast-5-ene-3 β ,7 α -diol。

化合物 8: 无色油状物质, 分子式 $\text{C}_{21}\text{H}_{38}\text{O}_4$, ESI-MS m/z : 377 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 。 ^1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 0.89 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, H-18'), 1.60 (2H, m, H-3'), 2.04 (4H, m, H-8', 14'), 2.34 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-2'), 2.76 (2H, t, $J = 6.5$ Hz, H-11'), 3.53 (1H, m, H-3b), 3.54 (1H, m, H-3a), 3.80 (1H, m, H-2), 4.04 (1H, dd, $J = 4.3, 11.4$ Hz, H-1b), 4.13 (1H, dd, $J = 6.3, 11.4$ Hz, H-1a), 5.32 (4H, m, H-9', 10', 12', 13'); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 66.5 (C-1), 71.1 (C-2), 64.1 (C-3), 175.6 (C-1'), 34.9 (C-2'), 26.0 (C-3'), 30.7 (C-4'), 30.5 (C-5'), 30.3 (C-6'), 30.2 (C-7'), 28.1 (C-8'), 130.9 (C-9'), 129.1 (C-10'), 26.5 (C-11'), 129.1 (C-12'), 130.9 (C-13'), 28.1 (C-14'), 30.18 (C-15'), 32.7 (C-16'), 23.6 (C-17'), 14.4 (C-18')。以上波谱数据与文献 [20] 报道的基本一致,故鉴定为亚油酸甘油酯。

8 种化合物的分子结构式见图 1。

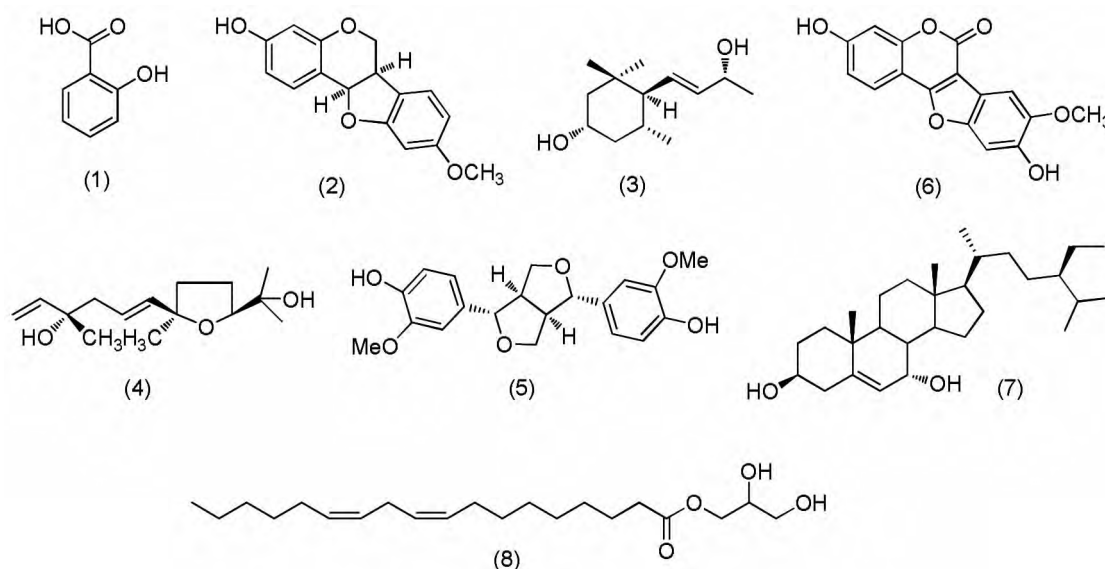


图 1 化合物 1 ~ 8 的化学结构

Fig. 1 Chemical Structures of compounds 1 ~ 8

2.2 抑菌活性结果 香蕉枯萎菌、胶孢炭疽菌在 24 h 内形成明显抑菌圈,棉花枯萎菌和棉花黄萎菌在 36 h 内形成明显抑菌圈,测抑菌圈直径(D)。

抗胶孢炭疽菌活性检测结果: 化合物 1、化合物 2 和化合物 8 有抑菌圈(图 2)。水杨酸(化合物 1)对胶孢炭疽菌有较强的抑制活性,美迪紫檀素(化合物 2)和亚油酸甘油酯(化合物 8)对胶孢炭疽菌有微弱的抑制活性,它们的抑菌圈直径分别为 22.60, 11.41, 11.44 mm(表 1)。

抗香蕉枯萎菌、棉花枯萎菌、棉花黄萎菌活性检测结果: 化合物 1 对 3 种农业病原菌均有抑菌圈,化合物 2 对棉花黄萎病菌有抑菌圈(图 3)。水杨酸(化合物 1)对棉花枯萎菌、棉花黄萎菌和香蕉枯萎菌的抑制活性相近,它们的抑菌圈直径分别为 18.25, 18.29 和 17.92 mm,其抑菌活性略低于阳性对照多菌灵。美迪紫檀素(化合物 2)对棉花黄萎病的抑菌圈直径为 8.67 mm,其抑菌活性要远小于阳性对照多菌灵(表 2)。

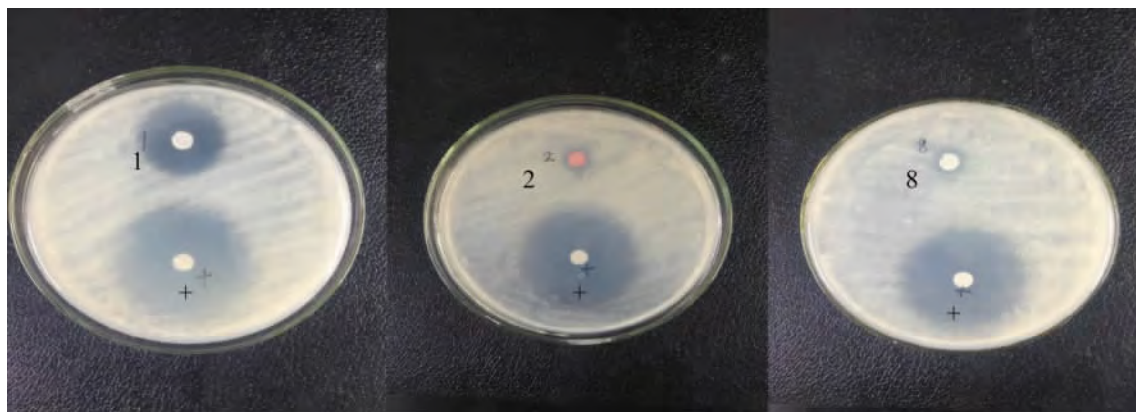


图2 化合物1,2和8对胶孢炭疽菌的抑制作用

Fig. 2 Antibacterial activities of compounds 1,2,8

表1 化合物1~8抗胶孢炭疽菌活性

Tab. 1 Antibacterial activities of compounds 1~8

化合物 Compound	抑菌圈平均直径(<i>D</i>) /mm Colony diameter	化合物 Compound	抑菌圈平均直径(<i>D</i>) /mm Colony diameter
1	22.60	5	0.00
2	11.41	6	0.00
3	0.00	7	0.00
4	0.00	8	11.44
阳性对照 Positive control	45.06		

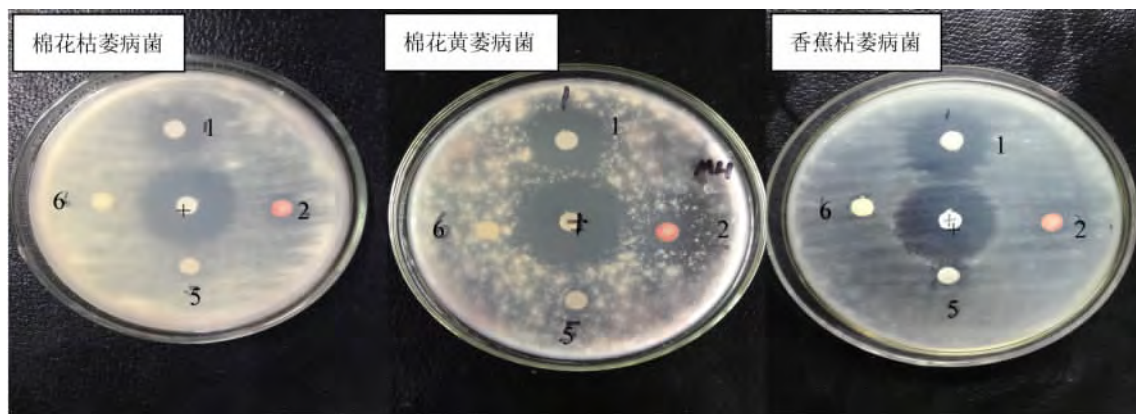


图3 化合物1,2,5和6对棉花枯萎病菌、棉黄枯萎病菌和香蕉枯萎病菌的抑制作用

Fig. 3 Antibacterial activities of compounds 1,2,5 and 6

表2 化合物1,2,5和6抗菌活性

Tab. 2 Antibacterial activities of compounds 1, 2, 5, 6

化合物 Compound	抑菌圈平均直径(<i>D</i>) /mm		
	香蕉枯萎菌 <i>F. oxysporum</i> f. sp. cuben	棉花枯萎菌 <i>F. oxysporum</i> f. sp. vasinfectum	棉花黄萎菌 <i>Verticillium dahlia</i> Kleb
1	18.25	18.29	17.92
2	0.00	0.00	8.67
5	0.00	0.00	0.00
6	0.00	0.00	0.00
阳性对照 Positive control	26.16	26.39	27.05

3 讨 论

本研究首次对 *Minerhao* 柱花草叶片的次级代谢产物进行分离纯化及其结构鉴定,并对分离得到的化合物进行抗炭疽菌活性测试。从 *Minerhao* 柱花草叶片乙醇提取物中分离得到 8 个化合物,分别为水杨酸、美迪紫檀素、aglycone of crotonionoside F、schensiand A、松脂醇、3'-methoxycoumestrol、Stigmast-5-ene-3 β ,7 α -diol 和亚油酸甘油酯,上述化合物均为从 *Minerhao* 柱花草中首次分离得到。

郑国兴等^[2]研究发现,水杨酸对白色假丝酵母和黑曲霉 2 种真菌的抑制活性明显。Bojase G 等^[23]研究发现,紫檀烷类化合物在抗酵母菌和念珠菌方面表现出良好的药理作用。脂肪酸及其衍生物对酵母菌及丝状真菌的生长有抑制作用^[24-26]。抗菌的活性测试显示,水杨酸、美迪紫檀素和亚油酸甘油酯对 8 号胶孢炭疽菌均有一定程度的生长抑制作用。这 3 种单体化合物对胶孢炭疽病原菌的抑制活性相对较弱,推测 *Minerhao* 柱花草可能是因多种抗性化合物共同作用的结果而高抗炭疽病,这还需做进一步研究。水杨酸对棉花枯萎菌、棉花黄萎菌和香蕉枯萎菌均有良好的抑制活性,可以考虑将其研发成为抗菌农药。美迪紫檀素对棉花黄萎病菌有一定的抑制作用,但抑菌活性较小。

本研究发现 *Minerhao* 柱花草对胶孢炭疽病原菌的抑制作用可能与其次级代谢产物有关,这为下一步通过高效液相法,用抗性单体化合物作为标准品,在感病和抗病柱花草的指纹图谱上进行次级代谢产物成分差异和含量的测定奠定了基础。同时为建立通过测定抗菌型次级代谢产物的类型和含量的差异来鉴定柱花草抗性的方法提供了理论基础,有利于加快育种进展。

参考文献:

- [1] 易克贤. 我国热带牧草产业化发展现状、前景与对策 [J]. 热带农业科学, 2001 (4): 30-32.
- [2] 蒋昌顺, 邹冬梅, 张义正. 柱花草炭疽病及其抗病育种研究进展 [J]. 四川草原, 2002 (1): 22-24.
- [3] 易克贤. 柱花草炭疽病及其抗病育种进展 [J]. 中国草地, 2001, 23(4): 59-65.
- [4] 张伟丽, 郭振飞, 何华玄. 水杨酸和草酸诱导柱花草对炭疽病的抗性 [J]. 中国草地学报, 2006, (4): 53-58.
- [5] 刘国道, 白昌军, 何华玄, 等. 热研 5 号柱花草选育研究 [J]. 草地学报, 2001, 9(1): 1-7.
- [6] 付海天, 赵英, 蒋昌顺. 柱花草炭疽病研究进展 [J]. 中国农学通报, 2006, 2(22): 385-385.
- [7] 蒋昌顺. 柱花草的研究进展 [J]. 热带作物学报, 2006, 26(4): 104-108.
- [8] 张伟丽, 郭振飞. 柱花草对炭疽病的抗病性研究进展 [J]. 草业科学, 2005, 22(3): 75-78.
- [9] 梁英彩, 赖志强. 907 柱花草的选育研究 [J]. 草业科学, 1998, 15(2): 27-29.
- [10] 严琳玲, 白昌军, 刘国道. 抗炭疽病柱花草空间育种新品系的多目标决策评价筛选 [J]. 草地学报, 2009, 17(1): 93-100.
- [11] 刘凤民, 张伟丽, 余士元, 等. 锌贝克、崇高和易斑净对柱花草炭疽病的防效 [J]. 草业科学, 2009, 26(8): 152-157.
- [12] 付海天. 抗病与感病柱花草叶片结构及蛋白质比较研究 [D]. 儋州: 华南热带农业大学, 2007.
- [13] Köse D A, Zümreoglu-Karan B, Hökelek T, et al. Boric acid complexes with organic biomolecules: Mono-chelate complexes with salicylic and glucuronic acids [J]. Inorganica Chimica Acta, 2010, 363(14): 4031-4037.
- [14] 刘劲松, 陈爱民, 许应生, 等. 紫藤瘤酯性成分研究 [J]. 中药材, 2013, 36(9): 1437-1440.
- [15] Kawakami S, Matsunami K, Otsuka H, et al. Crotonionosides A - G: Megastigmane glycosides from leaves of *Crotoncascarilloides Räuschel* [J]. Phytochemistry, 2011, 72(1): 147-153.
- [16] Zheng X K, Guo J H, Feng W S, et al. Three new sesquiterpenes from *Euonymus schensianus* Maxim [J]. Chinese Chemical Letters, 2009, 20(8): 952-954.
- [17] 冯超, 李晓明, 田敏卿, 等. 药用红树林植物黄槿的化学成分研究 [J]. 海洋科学, 2008(9): 57-60.
- [18] 巩婷, 王东晓, 刘屏, 等. 白花油麻藤化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2010 (13): 1720-1722.
- [19] 王紫娟, 赵勤实, 彭丽艳, 等. 菜蕨的化学成分研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2009(6): 960-962, 983.
- [20] Okuyama E, Hasegawa T, Matsushita T, et al. Analgesic components of *Saposhnikovia* root (*Saposhnikovia divaricata*) [J]. Chem pharm bulletin, 2001, 49(2): 154-160.
- [21] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1651.
- [22] 郑国兴, 张春乐, 黄浩, 等. 水杨酸的抑酶与抑菌作用 [J]. 厦门大学学报, 2006(45): 19-22.
- [23] Bojase G, Majinda R R, Gashe B A, et al. Antimicrobial flavonoids from *Bolusanthus* species [J]. Planta Medica, 2002, 68

- (7): 615 – 620.
- [24] Kabara J J, Vrable R, Lie Ken Jie M S F. Antimicrobial lipids: natural and synthetic fatty acids and monoglycerides [J]. Lipids, 1977, 12 (9): 753 – 759.
- [25] Buňková L, Krejčí J, Janí R, et al. Influence of monoacylglycerols on growth inhibition of micromycetes in vitro and on bread [J]. European Journal Lipid Science Technology, 2010, 112(2): 173 – 179.
- [26] Rai M K, Upadhyaya S, Andeo R M. Isolation of fungi from local bread of Chhindwara [J]. Indian Journal of Pathology & Microbiology, 1990, 33(2): 179 – 181.

Identification of Antibacterial Components from the Leaves of *Minerhao Stylosanthes*

LIU Wenchao¹, LIU Shoubai², MEI Wenli², DAI Haofu², JIANG Changshun³

(1. College of agronomy, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. Ministry of Agriculture Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Tropical Crops/, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101; 3. Environmental and Plant Protection Institute, CATAS, Haikou, Hainan 570101, China)

Abstract: Eight compounds were isolated from the leaves of *Minerhao stylosanthes* (*Stylosanthes guianensis* ‘Minerhao’) and purified by various column chromatographies on silica and sephadex LH-20 gel. Spectral analysis of NMR and MS showed that these compounds were identified based on their structures as salicylic acid (1), medicarpin (2), aglycone of crotonionoside F (3), schensiand A (4), pinoresinol (5), 3'-methoxy-coumestrol (6), stigmast-5-ene-3 β ,7 α -diol (7) and glycerol monolinoleate (8). Antibacterial activity assay by using the filter paper agar diffusion method showed that compound (1) had inhibitory effect on *Collectotrichum gloeosporioides* (Pent.) Sacc, *F. oxysporum* f. sp. Cuben, *F. oxysporum* f. sp. Vasinfectum and *Verticillium dahlia* Kleb, compound (2) on *C. gloeosporioides* (Pent.) Sacc and *V. dahlia* Kleb, and compound (8) on *C. gloeosporioides* (Pent.) Sacc.

Keywords: *Stylosanthes guianensis* ‘Minerhao’; anthracnose; chemical constituents; antibacterial activities