

文章编号: 1674-7054(2019)03-0222-04

单叶蔓荆子提取物的抑菌活性

沈恬安, 杨德友, 骆焱平, 王兰英

(海南大学 植物保护学院, 海口 570228)

摘要: 采用冷浸法对单叶蔓荆子植物的种子和叶进行浸提, 进一步采用生长速率法将获得的粗提物浸膏用于植物病原真菌拮抗活性的测定。结果发现, 单叶蔓荆子植物的种子和叶粗提物对靶标菌抑制能力不同, 其中叶部粗提物对小麦赤霉病菌抑菌效果最好, 培养后期抑菌率可达 50%; 种子粗提物对小麦赤霉病菌、苹果轮纹病菌以及水稻稻瘟病菌均有很好的抑菌活性。种子粗提物抑菌活性优于叶部粗提物, 其提取物对小麦赤霉病菌、苹果轮纹病菌的毒力抑制中浓度分别为 112.53 1, 142.49 g · L⁻¹。

关键词: 单叶蔓荆子; 植物粗提物; 抑菌活性

中图分类号: S 482.293

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2019.03.002

蔓荆子(*Vitex trifolia* Linn.) 属马鞭草科(Verbenaceae) 牡荆属(*Vitex* Linn.)^[1], 最初收录在《神农本草经》中, 广泛分布于我国的沿海沙滩地^[2], 其化学活性组分包括萜类^[3]、蒽烯^[4]、脂肪酸^[5]、氨基酸^[6]、黄酮酚类^[7]和微量元素^[8]等。关于蔓荆子的研究主要集中在医用活性方面, 据报道蔓荆子有治疗头痛^[9]、免疫性炎症^[10]、降压^[11]、防癌和肿瘤^[12]、祛痰平喘^[13]、抗衰老^[14]、抗病毒^[15]等功效。此外, 也有研究指出蔓荆子是我国南方固沙的先锋植物, 不仅可固沙改土, 还可改良土壤, 甚至改善环境条件。关于其农学方面的研究相对较少。笔者以单叶蔓荆子为研究对象, 对其种子和叶进行粗提, 并测定粗提物的抑菌活性, 旨在明确蔓荆子在农业领域的潜在应用价值。

1 材料与方法

1.1 植物样品与菌种 单叶蔓荆子采自海南省海口市昌江县棋子湾, 采回后将叶与种子分开, 置于阴凉处晾干, 在干燥箱中 40~60 °C 烘干 3 d, 经粉碎机粉碎后称重并密封, 置于 0~4 °C 冰箱中保存备用。主要供试菌种: 水稻稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*)、橡胶炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides* Penz. Sacc)、黄瓜枯萎病菌(*Fusarium omyzporum* (Schl) f. sp. *cucumerinum*)、小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*)、苹果轮纹病菌(*Botryosphaeria dothidea*)和芒果蒂腐病菌(*Botryodiplodia theobromae*)、香蕉枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, Foc)、芒果炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides* Penz)、火龙果黑斑病菌(*Bipolaris cactivora* (Petra) Alcorn)、香蕉炭疽病菌(*Colletotrichum musae* (Berk&Curt) Arx)、葡萄溃疡病菌(*Botryosphaeria dothidea*)和番木瓜炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*), 均由海南大学农药实验室提供。试验对照药剂: 杀菌剂苦参碱(水剂, 有效成分≥0.3%)

1.2 单叶蔓荆子粗提物制备 采用冷浸法^[16]制备单叶蔓荆子粗提物: 取植物样品种子和叶子, 置于烘箱内烘干 3 d, 粉碎后称重。取上述种子和叶子粉末, 加入适量丙酮(以浸过植物材料为宜)在 25 °C 条件下浸渍提取 72 h, 抽滤 3 次, 合并滤液减压浓缩, 得到单叶蔓荆子种子和叶部的丙酮浸膏。

收稿日期: 2019-06-20

基金项目: 海南省高等学校科学研究资助项目(Hnky2017ZD-2)

作者简介: 沈恬安(1994-), 女, 海南大学热带农林学院 2017 级硕士研究生. E-mail: 81372772@qq.com

通信作者: 王兰英(1976-), 女, 博士, 副教授. 研究方向: 天然产物农药. E-mail: daivemuwly@126.com

1.3 培养平板的制作 分别称取单叶蔓荆子种子和叶部浸提膏 1.4 g, 加入 2 mL 丙酮, 用无菌水定容至 7 mL, 配制成 $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 母液, 备用; 将 19 mL PDA 培养基装于 50 mL 锥形瓶中, $121 \text{ }^\circ\text{C}$ 灭菌 30 min, 待培养基冷却后加入 1 mL 单叶蔓荆子提取物, 混匀, 分别倒入 3 个 6 cm 培养皿中, 制成最终浓度为 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的含毒培养平板。以含有相同浓度的丙酮做阳性对照, 以含有 $0.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的苦参碱为阴性对照。

1.4 单叶蔓荆子粗提物抑菌活性测定 分别将供试靶标真菌接种于 PDA 培养基上适温培养 3 d, 用直径为 5 mm 的打孔器打取菌饼, 接种于上述培养平板中央。适温培养 3 d, 用十字交叉法测量菌落直径, 按照下列公式计算抑菌率。

$$\text{病菌生长抑制率} = \frac{(\text{对照菌落直径} - \text{处理菌落直径})}{\text{对照菌落直径}} \times 100\%$$

1.5 单叶蔓荆子种子粗提物毒力方程建立 按照 1.3 中方法将单叶蔓荆子种子粗提物配制成质量浓度为 400, 200, 100, 50, 25 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 分别移取 1 mL 加入至 19 mL 灭菌的 PDA 中, 摇匀后迅速分装于 3 个 6 cm 的培养皿中, 待培养基凝固后分别接入直径为 5 cm 的小麦赤霉病菌、苹果轮纹病菌菌种。25 $^\circ\text{C}$ 培养 72 h, 十字交叉法测量菌落直径, 按照 1.4 中公式计算抑菌率, 建立毒力回归方程, 求 EC_{50} 。

2 结果与分析

3.1 单叶蔓荆子叶部粗提物抑菌活性测定 采用生长速率法测定单叶蔓荆子叶部粗提物对水稻稻瘟病菌等 6 种植物病原真菌的抑菌活性, 结果(表 1) 发现: 该粗提物对不同靶标菌抑菌活性不同, 其中对小麦赤霉病菌抑菌效果最好, 培养后期抑菌率可达 50%; 对橡胶炭疽病菌活性最差, 培养后期对该靶标菌起到促进生长作用。总体来看, 单叶蔓荆子叶部粗提物对供试靶标菌抑菌活性均低于阳性对照(苦参碱)。

表 1 单叶蔓荆子叶部粗提物抑菌活性测定

Tab. 1 Determination of antifungal activity of leaf crude extract from *Vitex trifolia*

供试靶标菌 Target fungus	苦参碱的抑菌率/% Inhibitory rate of matrine			单叶蔓荆子叶部粗提物的抑菌率/% Inhibitory rate of leaf crude extract from <i>Vitex trifolia</i>		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
	DW	53.42	69.74	64.21	35.62	35.96
XT	21.43	*	21.88	0	*	*
HK	24.14	54.74	54.50	*	36.50	28.50
XC	50.00	60.67	68.75	26.92	50.00	53.68
PL	41.86	80.99	34.57	55.81	29.75	34.57
MD	82.54	81.90	58.82	41.27	33.81	43.24

注: DW: 水稻稻瘟病菌, XT: 橡胶炭疽病菌, HK: 黄瓜枯萎病菌, XC: 小麦赤霉病菌, PL: 苹果轮纹病菌, MD: 芒果蒂腐病菌 “*” 表示促进效果。

Note: DW: *Magnaporthe oryzae*; XT: *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. Sacc; HK: *Fusarium omysporum* (Schl) f. sp. *cucumerinum*; XC: *Fusarium graminearum*; PL: *Botryosphaeria dothidea*; MD: *Botryodiplodia theobromae*. “*” indicates a promoting effect

3.2 单叶蔓荆子种子粗提物抑菌活性测定 采用生长速率法测定单叶蔓荆子种子粗提物对水稻稻瘟病菌等 12 种植物病原真菌的抑菌活性(表 2)。结果发现: 该粗提物对供试的 8 种靶标菌均有不同程度的抑菌活性, 尤其对小麦赤霉病菌和苹果轮纹病菌持效性好, 测试时间内对小麦赤霉病菌抑菌率可达 70%, 对苹果轮纹病菌抑菌率达 60% 以上; 此外, 该粗提物对水稻稻瘟病菌培养 24 h 抑菌率可达 83.56%, 后期虽然抑菌效果有所下降, 但抑菌率仍在 60% 左右; 该粗提物对橡胶炭疽病菌、芒果炭疽病菌、火龙果黑斑病菌及番木瓜炭疽病菌均表现出促进菌丝生长的作用。所获得的数据整体来看, 单叶蔓荆子种子粗提物普遍低于阳性对照(苦参碱)。

表2 单叶蔓荆子种子粗提物抑菌活性测定

Tab. 2 Determination of antifungal activity of seed crude extract from *Vitex trifolia*

供试靶标菌 Target fungus	苦参碱的抑菌率/% Inhibitory rate of matrine			单叶蔓荆子叶部粗提物的抑菌率/% Inhibitory rate of leaf crude extract from <i>Vitex trifolia</i>		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
	DW	53.42	69.74	64.21	83.56	64.04
XT1	21.43	*	21.88	0	*	*
HK	24.14	54.74	54.50	20.25	57.66	50.0
XC	50.00	60.67	68.75	76.92	73.33	76.84
PL	41.86	80.99	34.57	72.09	64.88	60.49
MD	82.54	81.90	58.82	46.03	30.00	27.06
XK	60.00	42.13	42.28	34.29	18.52	22.48
MT	44.64	37.82	35.18	*	*	*
HH	*	*	*	*	*	*
XT2	100	67.89	61.09	60.00	25.33	19.23
PK	47.37	71.40	66.73	7.89	33.02	16.36
FT	15.00	18.72	19.85	*	*	*

注: DW: 水稻稻瘟病菌, XT1: 橡胶炭疽病菌, HK: 黄瓜枯萎病菌, XC: 小麦赤霉病菌, PL: 苹果轮纹病菌, MD: 芒果蒂腐病菌, XK: 香蕉枯萎病菌, MT: 芒果炭疽病菌, HH: 火龙果黑斑病菌, XT2: 香蕉炭疽病菌, PK: 葡萄溃疡病菌, FT: 番木瓜炭疽病菌 “*”表示促进效果

Note: DW: *Magnaporthe oryzae*; XT1: *Colletotrichum gloeosporioides* Penz; Sacc. HK: *Fusarium omysporum* (Schl) f. sp. *cumerinum*; XC: *Fusarium graminearum*; PL: *Botryosphaeria dothidea*; MD: *Botryodiplodia theobromae*; XK: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, Foc; MT: *Colletotrichum gloeosporioides* Penz; HH: *Bipolaris cactivora* (Petrak) Alcorn; XT2: *Colletotrichum musae* (Berk&Curt) Arx; PK: *Botryosphaeria dothidea*; FT: *Colletotrichum gloeosporioides*. “*” indicates a promoting effect

3.3 单叶蔓荆子种子粗提物毒力方程的建立 采用生长速率法测定单叶蔓荆子种子粗提物对小麦赤霉病菌、苹果轮纹病菌的毒力(表3)。结果发现,针对2种靶标菌单叶蔓荆子种子粗提物毒力方程 R^2 均在0.9之上,说明方程相关性好,可信度高。根据相应毒力方程计算对小麦赤霉病菌、苹果轮纹病菌抑制中浓度分别为112.53, 142.49 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

表3 TTY及中间体抑菌活性测定

Tab. 3 Determination of antifungal activity of TTY and intermediates

供试靶标菌 Target bacteria	毒力方程 Virulence equation	$EC_{50} / (\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	R^2	95%置信限 95% confidence limits
小麦赤霉病菌 <i>Fusarium graminearum</i> , PL	$y = 1.753 9x + 1.402 3$	112.53	0.927 9	98.645 1 ~ 135.012 0
苹果轮纹病菌 <i>Botryosphaeria dothidea</i>	$y = 1.436 5x + 1.906 1$	142.49	0.960 9	119.457 6 ~ 160.022 1

4 讨论

小麦赤霉病是小麦在全世界普遍发生的主要病害之一,已成为影响小麦高质量、高产量的重大隐患,若防治不当会造成小麦减产乃至绝收等情况^[17];苹果轮纹病又称粗皮病、轮纹烂果病,是苹果主要病害之一,主要危害部位在树干和果实,植株得病后,其树势、果实会严重的削弱和腐烂,后果不容忽视^[18]。生物防治植物病害因具备对生态环境影响小,低残留、无污染的等优点越来越受到人们重视。本研究发现单叶蔓荆子叶子粗提物对供试靶标菌影响力不同,尤其对小麦赤霉病菌和苹果轮纹病菌抑菌活性高、持效性长,具有进一步开发应用的潜在价值。因此,在今后研究中有必要对其开展应用研究,为生物防治植物

病害奠定基础。另外,由于本研究仅用丙酮对供试的单叶蔓荆子的种子和叶进行提取,未尝试其他提取溶剂,因此鉴于该植物种子的优良性状,有必要采用不同极性的溶剂对其活性成分展开更为系统的提取研究。

参考文献:

- [1] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴[M]. 北京: 科学出版社, 1980: 159.
- [2] 胡园. 单叶蔓荆化学多样性与遗传多样性的关系及蔓荆子抗 PMS 作用机制[D]. 上海: 第二军医大学, 2007.
- [3] WOLLENWDBER E, MANN K. Flavonols from fruits of *Vitex agnus-castus* [J]. *Planta Media*, 1983, 48(2): 126–127.
- [4] 崔兆杰, 罗伟丽, 李斌, 等. 天然野生和种植药用蔓荆子化学成分研究天然野生和种植药用蔓荆子挥发油成分定性研究[J]. *药物分析杂志*, 1994, 14(3): 27–29.
- [5] 陈体强, 吴锦忠, 余德亿, 等. 不同采收期单叶蔓荆子挥发油成分的分析比较[J]. *林产化学与工业*, 2007, 27(6): 99–104.
- [6] 曾宪仪, 方乍浦, 吴永忠, 等. 蔓荆子化学成分研究[J]. *中国中药杂志*, 1996, 21(3): 167–168.
- [7] GU Q, ZHANG X M, ZHOU J, et al. One new dihydrobenzofuran lignan from *Vitex trifolia* [J]. *Journal of Asian Natural Products Research*, 2008, 10(6): 499–502.
- [8] 吴永忠, 朱良辉, 肖鸣. 不同产地蔓荆子化学成分含量比较[J]. *中药材*, 2000, 23(10): 616–618.
- [9] 刘亚英. 蔓荆子的有效成分和质量研究[D]. 黑龙江: 黑龙江中医药大学, 2002.
- [10] 藤木康雄. 蔓荆子的抗炎活性研究[J]. *国外医学: 中医中药分册*, 1986(6): 6.
- [11] 赵利新. 单叶蔓荆叶化学成分及蔓荆子的质量控制研究[D]. 山东: 山东中医药大学, 2013.
- [12] SINGH V, DAYAL R, BARTIEY J P. Chemical constituents of *Vitex ne-gundo* leaves [J]. *J. Med Arom Plant Sci.*, 2003, 25(1): 94–98.
- [13] 黄敬耀, 徐彭, 朱家谷, 等. 牡荆子平喘作用的药理实验研究[J]. *江西中西学院学报*, 2002, 14(4): 13–14.
- [14] 钟世同, 邱光铎, 刘元帛, 等. 单叶蔓荆子、蔓荆子、黄荆子、牡荆子的药理活性比较[J]. *中药药理与临床*, 1996, 12(1): 37.
- [15] 宋天英. 单叶蔓荆改善滨海沙地微环境研究初报[J]. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 2002, 31(4): 524–526.
- [16] 鲁世伟, 罗兰, 李玲玲. 22种植物乙醇提取物对植物病原菌的抑菌作用[J]. *中国农学通报*, 2010, 26(1): 98–102.
- [17] 张爱民, 阳文龙, 李欣. 小麦抗赤霉病研究现状与展望[J]. *遗传*, 2018, 40(10): 858–873.
- [18] 李佳, 石琰璟. 苹果轮纹病的抗性机制研究进展[J]. *落叶果树*, 2014, 46(1): 19–22.

Antifungal Activity of the Extract from *Vitex trifolia*

SHEN Tian'an, YANG Deyou, LUO Yanping, WANG Lanying

(College of Plant Protection, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: The seeds and leaves of *Vitex trifolia* were extracted by cold leaching method, and the crude extract was used to determine the antagonistic activity of plant pathogenic fungi by growth rate method. The results showed that the seed and leaf crude extract had different inhibitory ability to the target pathogen. The leaf crude extract had the best antifungal effect on *Fusarium graminearum*, and its inhibitory rate could be upto 50% at the late stage of culture, while the seed crude extract had a good antifungal activity against *Magnaporthe oryzae*, *F. graminearum* and *Botryosphaeria dothidea*. The seed crude extract had a higher antifungal activity than the leaf crude extract, and its EC_{50} values against *F. graminearum* and *Alternaria alternata* were $112.53 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ and $142.49 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively.

Keywords: *Vitex trifolia* Linn. var. *simplicifolia* Cham.; botanical extract; antifungal activity.

(责任编辑: 叶 静)