

# 前胡诱导水稻抗稻瘟病菌活性成分的提取与测定\*

陈桂华<sup>1</sup> 李静波<sup>2</sup> 蔡海林<sup>2</sup> 柏连阳<sup>2\* \*</sup>

1. 湖南农业大学农学院, 长沙 410128; 2. 湖南农业大学生物安全科技学院, 长沙 410128

**摘要** 为探索前胡(*Radix peucedani*)诱导水稻抗稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*)活性成分的活性, 采用生物活性跟踪法对前胡的诱抗活性成分进行了初步研究, 分离了前胡浸提物中的有效成分, 并对其生物活性进行了测定。结果表明: 前胡丙酮浸提物诱抗水稻抗稻瘟病菌的效果好于其他溶剂浸提物; 将丙酮浸提物通过硅胶柱层析, 分离得到 A4、A5、A6 流分, 其诱抗水稻抗稻瘟病菌的效果较强, 3 个流分不同质量浓度的诱抗效果达 21.48%~59.54%, 且在供试的 3 个质量浓度范围内, 都随着流分质量浓度的降低, 防效略有升高。

**关键词** 前胡; 诱导; 抗病性; 稻瘟病菌

**中图分类号** S 435.111.4<sup>+</sup>1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)03-0287-05

水稻稻瘟病是稻类作物中的三大病害之一, 在我国各个水稻生产区均有不同程度的发生, 流行年份重病地区一般减产达 10%~20%, 有些地区可达 40%~50%, 局部地区甚至颗粒无收<sup>[1]</sup>。目前稻瘟病的防治措施主要包括抗病品种选育、药剂防治和栽培管理<sup>[2]</sup>。而近几年由于一些病菌对杀菌剂产生抗性, 以及药剂对环境的污染, 化学诱导剂便应运而生<sup>[3]</sup>, 在农作物病害防治中已有很多运用十分成功的例子<sup>[4-7]</sup>。

前胡(*Radix peucedani*)又名土当归、野当归、独活, 多年生草本植物。前胡在医药保健中的作用众所周知<sup>[8]</sup>, 但在农业领域中作为植物源农药使用却鲜见报道。湖南农业大学罗宽等花了数年时间, 从 60 多种中药中经过层层筛选, 发现了前胡对水稻稻瘟病的诱导抗病性以及水稻的抗寒性<sup>[9-10]</sup>, 但对其诱导抗病性的研究目前仍处于起步阶段, 还有许多未知的领域有待探索, 如诱导抗性机制、有效成分的制备与纯化以及结构的确定等。本试验采用活性跟踪法对前胡诱导水稻抗稻瘟病菌的活性成分进行了初步研究, 旨在为研制开发新型植物源杀菌剂提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

前胡采购于湖南省长沙市老百姓大药房, 粉碎

后过孔径 0.256 mm 标准筛, 干燥后低温保存备用。主要试剂丙酮、乙酸乙酯、乙醇、三氯甲烷、石油醚、正丁醇均为分析纯。供试菌种稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*)由湖南农业大学生物安全科技学院提供。供试水稻品种为感病品种 T 优 180。

### 1.2 活性成分的提取与分离

称取 10 g 前胡干粉 7 份, 分装于带塞的广口瓶中, 分别用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇、丙酮、乙醇、水对前胡进行浸泡提取 24 h, 料液比 1:10, 提取 3 次, 合并提取液并过滤, 3 000 r/min 离心 15 min, 将上清液经旋转蒸发仪浓缩后冷冻干燥, 得到石油醚浸提物 W1、氯仿浸提物 W2、乙酸乙酯浸提物 W3、正丁醇浸提物 W4、丙酮浸提物 W5、乙醇浸提物 W6、水浸提物 W7, 分别称量各浸提物, 计算提取率。通过生物活性跟踪, 发现丙酮浸提物 W5 的生物活性最强。将丙酮浸提物采用硅胶柱层析方法进行柱层析分离, 洗脱液为石油醚、乙酸乙酯配成的一系列极性由低到高的溶剂。以 80 mL/h 的流速洗脱, 并用分步收集仪收集洗脱液 100 mL/瓶。经 TLC 和 5% 的硫酸乙醇溶液加热显色监测柱层析中各组分的变化, 根据成分的变化调整洗脱剂的比例。共收集 189 份, 分别进行 TLC 检测, 合并相同 R<sub>f</sub> 值的洗脱液, 得到 7 个不同的流分, 第 1~9 瓶合并为 A1, 第 10~29 瓶合并为 A2, 第 30~55 瓶合并为 A3, 第 56~96 瓶合并为 A4, 第 97~116 瓶合并为

收稿日期: 2009-08-25; 修回日期: 2010-01-18

\* 国家自然科学基金项目(30771436)、湖南省重点科技项目(2007NK2005)和湖南省杰出青年科学基金项目(05JJ10005)资助

\*\* 通讯作者。E-mail: bly8253@hunau.net

陈桂华, 女, 1977 年生, 博士, 讲师。研究方向: 生物农药。E-mail: cghtwb@yahoo.com.cn

A5,第 117~140 瓶合并为 A6,第 141~189 瓶合并为 A7。将该 7 个馏分进行减压浓缩干燥后,称取适量配成试验所需浓度进行诱导水稻抗稻瘟病的活性试验,确定活性成分所在部位。

### 1.3 生物活性的测定

按常规方法培育水稻幼苗,在水稻苗 3 叶 1 心叶期,分别取已分离纯化的前胡提取物各 10 mg 溶于水(加 0.2% 的吐温-80),并配成 100 mg/L(I)、500 mg/L(II)和 1 000 mg/L(III)3 个质量浓度处理 3 叶 1 心期的水稻幼苗,喷施在盆栽的水稻感病品种 T 优 180 叶片上,使叶片均匀布满水珠,以加有 0.2% 的吐温-80 的清水喷雾处理作对照(CK<sub>1</sub>),并以好米得(8% probenazole)为药剂对照(CK<sub>2</sub>)。每处理设 3 个重复,每重复分别处理 25~30 株水稻幼苗。

处理 2 d 后用稻瘟病菌的强致病菌喷雾接种,分生孢子浓度为  $1.0 \times 10^5$  个/mL,用手持喷雾器将孢子悬浮液均匀喷雾于叶面,保湿 24 h 后置于温室中培养。接种 7~10 d 后调查每稻叶的发病情况,按文献[11]中苗期接种抗性的测定方法记载接种叶片发病级数、水稻总株数和发病株数,并分别计算病情指数。

诱抗效果以病指下降百分率表示:

$$\text{诱抗效果} = \frac{\text{对照病指} - \text{病指处理}}{\text{对照病指}} \times 100\%$$

### 1.4 菌丝生长及孢子萌发的观察

采用平板法测定,在已灭菌的培养基中分别加入硅胶柱层析物 A1~A7,使培养基中各提取物的质量浓度 50 mg/L,冷却后制成平板,将菌饼转移到含有前胡提取物的平板上,于 26 °C 的恒温箱中培养,7 d 后测量菌落直径,3 次重复。平板上涂抹适量的稻瘟菌孢子悬浮液,26 °C 下培养 6 h 后观察记载孢子萌发率。对照均为培养基中加入与各提取物溶液等量的灭菌水后制成平板。

### 1.5 数据处理

全部试验数据用 Excel 软件进行计算处理,再用 DPS 数据处理系统进行统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同溶剂对前胡有效成分浸提的提取率

试验结果表明,不同溶剂对前胡有效成分浸提的提取效果不同。由表 1 可知,在供试不同溶剂中,前胡的水浸提物最多,其提取率为 12.5%,而前胡

的石油醚浸提物最少,其提取率仅为 4.9%。不同溶剂提取同种植物的提取率各不相同,这说明溶剂的本身能决定被溶解物质的多少。

表 1 不同溶剂对前胡的浸提率

Table 1 The extract rate of *R. peucedani* with different solvents

溶剂 Solvent	提取物状态 State of extract	提取率/% Extract rate
石油醚 Petroleum ether	棕褐色浸膏 Brown extract	4.9
氯仿 Chloroform	黄色浸膏 Yellow extract	8.4
乙酸乙酯 Ethyl acetate	褐色浸膏 Brown extract	9.4
正丁醇 Butanol	褐色浸膏 Brown extract	6.0
丙酮 Acetone	黄色浸膏 Yellow extract	11.8
95%乙醇 95% ethanol	黄色浸膏 Yellow extract	8.9
水 Water	黑色固体 Black solid	12.5

### 2.2 前胡不同溶剂浸提物的生物活性

由表 2 可知,在供试的 3 种质量浓度下,除 W4 处理的每叶平均病斑数、病株率、病情指数,W1 的 3 个质量浓度的病情指数、W1 的浓度 II 和浓度 III 处理的病株率、浓度 I 和浓度 II 的每叶平均病斑数与对照差异不显著外,其他 5 种浸提物的 3 个质量浓度处理后的水稻每叶平均病斑数、病株率、病情指数均显著低于未经药剂处理的对照(CK<sub>1</sub>),其中 W5、W7 处理的水稻每叶平均病斑数、病株率、病情指数的下降幅度最大,诱抗效果也明显好于其他浸提物的处理。

不同溶剂的浸提物在供试的 3 个质量浓度下,以及同种浸提物在不同质量浓度下对水稻的诱导抗病性指标虽有不同,但无规律性变化。有些浸提物的 3 个质量浓度之间差异显著,而有些浸提物的 3 个质量浓度之间无显著性差异。除 W5 的浓度 I、II 处理的诱抗效果与药剂对照好米得(CK<sub>2</sub>)差异不显著外,其他浸提物的不同浓度处理的诱抗效果均低于药剂对照好米得。

综合考虑每叶平均病斑数、病株率、病情指数及诱抗效果等抗病性指标,可得出不同溶剂浸提物的诱抗效果顺序:丙酮浸提物(W5)>水浸提物(W7)>乙酸乙酯浸提物(W3)>乙醇浸提物(W6)>三氯甲烷浸提物(W2)石油醚浸提物(W1)>正丁醇浸提物(W4)。由于 W5 和 W7 效果较好可作为进一步分离目标,但 W7 含糖分和皂甙较多且难于分离,因此选择 W5(丙酮浸提物)继续追踪分离。

表 2 前胡不同溶剂浸提物诱导水稻抗稻瘟病菌的作用效果<sup>1)</sup>

Table 2 Effect of different solvent extracts on induced resistance to *M. grisea*

提取物 Extracts	$\rho$ /(mg/L)	病株率/% Rate of diseased plants	每叶平均病斑数 Number of lesions per leaf	病情指数 Disease index	诱抗效果/% Effect of induced resistance
W1	100	85.68±7.35 bcd	9.77±0.28 abc	77.80±0.98 a	3.76±1.22 h
	500	96.37±3.17 a	9.98±0.36 ab	78.47±0.42 a	2.93±0.52 h
	1 000	100.00±0.00 a	9.23±0.23 bcd	75.45±0.96 ab	6.65±1.19 gh
W2	100	83.68±1.66 cde	8.69±0.24 d	67.82±1.12 c	16.10±1.38 f
	500	81.42±3.91 cde	8.91±0.20 cd	70.43±2.98 bc	12.87±3.68 fg
	1 000	80.51±3.87 cde	8.74±0.21 d	67.28±2.39 c	16.76±2.96 f
W3	100	76.85±1.60 def	6.64±0.19 e	56.11±1.47 d	30.58±1.82 e
	500	71.39±1.36 ef	6.20±0.34 e	53.80±0.86 de	33.44±1.07 de
	1 000	67.89±4.35 fg	6.27±0.45 e	49.72±2.24 ef	38.49±2.77 cd
W4	100	100.00±0.00 a	9.41±0.74 abcd	79.44±0.96 a	1.72±1.19 h
	500	91.97±7.56 abc	9.56±0.57 abcd	77.65±3.20 a	3.94±3.96 h
	1 000	100.00±0.00 a	9.77±0.25 abc	79.17±1.44 a	2.06±1.79 h
W5	100	43.89±0.50 hi	3.68±0.33 hi	31.88±0.55 gh	60.56±0.68 ab
	500	43.97±4.08 hi	3.61±0.11 i	33.44±1.50 gh	58.63±1.86 ab
	1 000	48.33±2.89 hi	3.81±0.17 ghi	35.37±3.35 g	56.24±4.14 b
W6	100	83.40±2.00 gh	8.64±0.21 d	66.02±2.24 c	18.33±2.77 f
	500	86.28±4.37 cde	9.00±0.55 bcd	68.61±1.13 c	15.12±1.39 f
	1 000	83.93±3.31 bcd	9.27±0.18 bcd	70.41±2.51 bc	12.89±3.11 fg
W7	100	57.14±7.14 fg	4.67±0.29 fgh	46.40±1.19 f	42.60±1.47 c
	500	51.28±3.69 hi	4.73±0.24 fg	46.37±1.77 f	42.64±2.19 c
	1 000	56.81±5.18 gh	5.68±0.11 ef	48.20±2.22 ef	40.37±2.75 cd
CK <sub>2</sub>		41.85±4.21 hi	3.24±0.30 i	28.96±3.00 h	64.17±3.71 a
CK <sub>1</sub>		100.00±0.00 a	10.40±0.23 a	80.83±1.44 a	—

1)表中纵列数据后字母相同者,表示差异不显著( $P>0.05$ ,下表同)。

The data within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% level(the same as following tables).

表 3 硅胶柱不同流分诱导水稻抗稻瘟病菌的作用效果

Table 3 Effect of different silica gel column chromatography extracts on induced resistance to *M. grisea*

提取物(W5) Extracts	$\rho$ /(mg/L)	病株率/% Rate of diseased plants	每叶平均病斑数 Number of lesions per leaf	病情指数 Disease index	诱抗效果/% Effect of induced resistance
A1	50	50.79±1.37 bcde	4.49±0.12 b	41.31±0.34 bc	7.20±0.76 jk
	100	51.39±2.41 bcd	4.18±0.07 bcde	40.53±0.48 bcd	8.96±1.09 ijk
	200	45.85±1.22 defg	3.95±0.06 def	38.34±0.49 e	13.87±1.10 h
A2	50	49.40±3.31 cdef	4.19±0.06 bcde	39.39±0.54 cde	11.51±1.20 hij
	100	46.75±1.33 defg	4.03±0.02 cde	39.72±0.48 cde	10.76±1.08 hij
	200	47.58±0.95 defg	4.02±0.09 cde	38.87±0.50 de	12.69±1.11 hi
A3	50	56.31±1.35 ab	4.52±0.07 ab	41.85±0.54 b	5.98±1.22 k
	100	43.21±1.77 fgh	3.97±0.07 def	40.64±0.57 bcd	8.71±1.29 ijk
	200	44.78±1.91 efg	3.61±0.09 fg	35.63±0.42 f	19.96±0.94 g
A4	50	28.12±0.41 i	3.15±0.11 hi	19.95±0.88 jk	55.18±1.97 bc
	100	27.07±0.35 ij	2.44±0.14 jkl	23.31±0.56 h	47.63±1.26 e
	200	37.58±1.26 h	2.29±0.15 kl	30.30±0.52 g	31.92±1.18 f
A5	50	20.56±1.78 k	2.62±0.16 jk	18.01±1.05 k	59.54±2.37 b
	100	26.39±4.22 ijk	2.31±0.12 kl	19.45±0.5 jk	56.31±1.19 bc
	200	29.94±1.34 i	2.23±0.24 kl	22.13±0.32 hi	50.27±0.72 de
A6	50	24.18±3.81 ijk	3.48±0.18 gh	20.32±0.55 ij	54.36±1.24 cd
	100	27.94±1.10 i	2.77±0.04 ij	23.43±1.16 h	47.37±2.60 e
	200	41.87±2.30 gh	2.46±0.14 jkl	34.95±0.83 f	21.48±1.87 g
A7	50	57.75±1.16 a	4.29±0.22 bcd	40.68±0.61 bcd	8.61±1.37 ijk
	100	54.82±2.17 abc	4.40±0.07 bc	40.61±0.53 bcd	8.77±1.19 ijk
	200	41.90±1.65 gh	3.83±0.08 efg	34.67±0.92 f	22.12±2.06 g
CK <sub>2</sub>		21.60±1.46 jk	2.12±0.12 l	14.37±0.27 l	67.73±0.61 a
CK <sub>1</sub>		52.01±2.09 abc	4.91±0.18 a	44.51±1.1 a	—

### 2.3 硅胶柱层析各流分的生物活性

由于丙酮提取物(W5)含有许多蜡质,所以先用石油醚去油脂和蜡质后再用硅胶柱层析进一步进行分离,得 A1~A7 共 7 个流分。将 A1~A7 配成 50 mg/L(I)、100 mg/L(II)和 200 mg/L(III)3 个质量浓度后再诱导水稻抗稻瘟病,并测定出各流分不同质量浓度对水稻稻瘟病的诱导抗性效果。

从表 3 可以看出,丙酮提取物经过硅胶柱层析所得的 7 个流分处理水稻后的病情指数均显著低于未经药剂处理的对照(CK<sub>1</sub>),其中 A4、A5、A6 诱抗效果较强,三者处理水稻后的病株率和每叶平均病斑数明显少于未经药剂处理的对照。不同质量浓度的同一种提取物对水稻幼苗的诱抗效果不同,且在供试的 3 个质量浓度范围内,三者都随着质量浓度的降低防效略有升高,在质量浓度为 50 mg/L 时诱抗效果都超过了 50%。

### 2.4 前胡提取物对菌丝及孢子萌发的影响

从表 4 可以看出,在含 50 mg/L 硅胶柱层析物的培养基上,7 d 后稻瘟病菌菌落直径均为 4.37~4.47 cm,与对照的 4.58 cm 几乎没有区别;6 h 后稻瘟病菌孢子萌发率达 90.2%~91.9%,不含提取物的对照培养基上的孢子萌发率为 92.7%,说明 50 mg/L 的硅胶柱层析物对稻瘟病菌没有直接毒性。据此可推断供试前胡提取物处理稻苗后叶瘟病指的下降,主要是由于因提取物处理后提高了稻苗本身对稻瘟病的抗性,即产生了诱导抗性而引起的。

表 4 前胡丙酮提取物 7 个流分对稻瘟病菌菌丝及孢子萌发的影响

Table 4 Effect of seven extracts from acetone extracts on the and mycelium growth of *M. grisea*

流分 Extracts	菌落直径/cm Colony diameter	孢子萌发率/% Spore germination rate
A1	4.37±0.03 b	91.9±1.2 a
A2	4.43±0.06 ab	90.7±1.6 a
A3	4.45±0.09 ab	90.8±1.2 a
A4	4.47±0.13 ab	90.2±3.4 a
A5	4.38±0.10 b	91.1±1.3 a
A6	4.43±0.08 ab	90.3±2.6 a
A7	4.41±0.06 ab	91.4±1.8 a
CK	4.58±0.06 a	92.7±0.4 a

## 3 讨论

前胡植物资源丰富,临床应用历史悠久。国内外在前胡的药用资源、品种显微鉴定、主要成分含量测定及药理作用等方面进行了较详细的基础研究工作,但有关前胡在农业上作为植物源农药的利用鲜

见报道。本试验采用溶剂浸提法对前胡有效成分进行提取,通过生物活性实验筛选,发现前胡的丙酮浸提物对水稻稻瘟病菌有很强的生物活性。利用硅胶柱层析法进行有效成分的分离发现,流分 A4、A5、A6 对水稻稻瘟病菌有很强的生物活性,而丙酮浸提物和硅胶柱层析各流份对水稻稻瘟病菌的菌丝生长和孢子萌发均无明显影响,据此可推断供试前胡提取物处理稻苗后叶瘟病指的下降,主要是因为提取物处理后提高了稻苗本身对稻瘟病的抗性,即产生了诱导抗性而引起的。

近年来,环境保护和生物安全已成为全球关注的热点问题之一<sup>[12]</sup>。化学农药产生了一系列公害问题,例如环境污染、人畜中毒、杀伤天敌、破坏生态平衡、3R 等严重问题,这些不良影响已引起人们的普遍关注,因此,对农药进行重新评价,开发对人畜及环境安全的合理性农药是解决上述问题的重要途径之一<sup>[13]</sup>。天然产物具有极为丰富的化学结构以及多样的作用机理,是研发新药物的重要来源<sup>[14]</sup>。笔者从可持续发展的角度出发,充分利用现有的植物资源,开发具有与生物、环境和谐绿色植物源农药,旨在为新农药的研制和先导化合物的发现提供理论依据和技术支撑,也为前胡这一植物资源的综合开发利用提供新途径。此外,笔者目前仅对前胡提取物诱抗活性进行了初步研究,至于其活性成分是什么物质还有待进一步分离提纯,并需作大田试验进行验证。

### 参 考 文 献

- [1] 杨小林,陈其志,张舒,等. 湖北省部分地区稻瘟病菌致病类型及丰富度分析[J]. 华中农业大学学报,2007,26(4):456-458.
- [2] 张传清,周明国,朱国念. 稻瘟病化学防治药剂的历史沿革与研究现状[J]. 农药学报,2009,11(1):72-80.
- [3] 李莉,郭晓丽,刘振蛟,等.  $\beta$ -氨基丁酸诱导水稻稻瘟病抗性的初步探讨[J]. 吉林农业科学,2007,32(3):45-47.
- [4] 唐保宏,杨帆,陈捷. 不同温度条件下氟灵对茄子黄萎病的诱抗效果[J]. 河南科学,2009,27(8):952-954.
- [5] BOKSHI A I, MORRIS S C, DEVERALL B J. Effects of benzothiadiazole and acetylsalicylic acid on  $\beta$ -1,3-glucanase activity and disease resistance in potato[J]. Plant Pathology, 2003,52:22-27.
- [6] EMMANUEL P, DANIEL L C, SILUE D. Phytogard and DL- $\beta$ -amino butyric acid(BABA) induce resistance to downy mildew(*Bremia lactucae*) in lettuce(*lactuca sativa* L.)[J]. European Journal of Plant Pathology,2001,107:861-869.

- [7] ZHANG S A, SCHISLER D A, BOEHM M J, et al. Utilization of chemical inducers of resistance and *Cryptococcus flavescens* OH182.9 to reduce *Fusarium* head blight under greenhouse conditions[J]. *Biological Control*, 2007, 42:308-315.
- [8] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:人民卫生出版社, 1995.
- [9] 郭建荣, 罗宽. 水稻品种抗瘟性诱导机制研究[J]. 湖南农学院学报, 1994, 20(3):255-262.
- [10] 王国平, 罗宽. 水稻品种抗瘟性诱导研究 I. 非生物诱导物的筛选及诱导方法初探[J]. 植物病理学报, 1994, 24(2):123-127.
- [11] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京:中国农业出版社, 1998.
- [12] 陈新林, 桑海旭. 植物源农药在水稻上的应用现状与展望[J]. 北方水稻, 2008, 38(9):6-9.
- [13] 吴新安, 花日茂, 岳永德, 等. 植物源抗菌、杀菌活性物质研究进展[J]. 安徽农业大学学报, 2002, 29(3):245-249.
- [14] 陈晓兰, 王忠文, 潘汝谦, 等. 一些药用植物对5种植物病原真菌的抗菌活性[J]. 华中农业大学学报, 2008, 27(6):718-722.

## Determination and Extraction of Active Components from *Radix peucedani* to Induce Rice Resistance to *Magnaporthe grisea*

CHEN Gui-hua<sup>1</sup> LI Jing-bo<sup>2</sup> CAI Hai-lin<sup>2</sup> BAI Lian-yang<sup>2</sup>

1. College of Agronomy, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

2. College of Bio-Safety Science and Technology,  
Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China

**Abstract** Preliminary study on the active component of *Radix peucedani* capable of inducing rice resistance to blast was carried out by tracing bioassay. The acetone extract showed better inductive effect on the resistance to rice blast disease (*Magnaporthe grisea*) compared to other solvent extracts. The acetone extract was isolated by silica gel column chromatography. The fractions A4, A5, A6 were more active than others. The effects of inducing resistance of the three fractions at different concentrations were 21.48%~59.54%, and in the three tested concentration range of quality, the effects were higher at the lower concentrations.

**Key words** *Radix peucedani*; induce; resistance; *Magnaporthe grisea*

(责任编辑:陈红叶)