

北细辛挥发油对 5 种镰刀菌的抑菌活性及其成分分析

于婷婷¹, 李强¹, 王茂青², 何朋¹, 尚坤¹, 吴秀菊^{1*}

¹东北农业大学生命科学院, 哈尔滨 150030; ²黑龙江省农垦总局科研育种中心, 哈尔滨 150036

摘要:以水蒸气蒸馏法提取北细辛挥发油, 通过菌丝生长速率法和孢子萌发法, 研究其对 5 种马铃薯干腐病致病菌镰刀菌的抑菌效果, 优化提取方法, 并采用气质联用法分析挥发油的化学成分。结果表明北细辛挥发油对 5 种供试镰刀菌抑制作用显著, 且抑菌活性与挥发油浓度呈剂量依赖性。不同方法提取的 4 组挥发油共鉴定出 51 种成分, 其中 18 种组分相同, 均以甲基丁香酚和黄樟醚为主, 两者总含量达 50% 以上。地下部分挥发油含量明显高于地上部分, 且超声辅助浸提法提取率更高。因此, 北细辛挥发油可进一步开发为植物源农药, 具有很好的开发前景。

关键词:北细辛; 挥发油; 镰刀菌; 抑菌活性; 植物源农药

中图分类号: Q949.96

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.07.019

Composition Analysis of *Asarum heterotropoides* Essential Oil and its Inhibitory Activity Against Five Species of *Fusarium*

YU Ting-ting¹, LI Qiang¹, WANG Mao-qing², HE Peng¹, SHANG Kun¹, WU Xiu-ju^{1*}

¹School of Life Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; ²Research and Breeding Center, the General Bureau of State Farm of Heilongjiang Province, Harbin 150030, China

Abstract: The inhibitory activity of *Asarum heterotropoides* essential oil extracted by steam distillation on five species of *Fusarium* leading to potato dry rot was tested by mycelium growth rate method and spore germination method. Steam distillation and ultrasonic-assisted extraction were utilized to optimize the extraction efficiency, and GC-MS was employed to analyze the constituents of essential oils. The results showed that the essential oil had a significant inhibitory activity on five species of tested *Fusarium*, which was in a dose-dependent manner with the concentration of essential oil. A total of 51 compounds were identified in essential oil by GC-MS, 18 of which were the same, while methyl eugenol and safrole were the main components in 4 groups of essential oils extracted by different methods. The content of essential oil of underground part was significantly higher than that of the aerial part and extraction rate of ultrasonic-assisted extraction method was higher. Therefore, essential oil of *A. heterotropoides* can be further developed as a plant derived antifungal agent with high development prospects.

Key words: *Asarum heterotropoides* var. *mandshuricum* (Maxim) Kitag; essential oil; *Fusarium*; inhibitory activity; plant derived antifungal agent

马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.) 是我国重要的经济作物, 其产量和种植面积随产业结构的调整逐年增加^[1], 而块茎腐烂是影响马铃薯产量和品质的主要限制因素之一, 其中由镰刀菌引发的干腐病是马铃薯贮藏期间引起块茎腐烂最常见的病害, 可导致窖储损失率高达 60%, 造成重大经济损失^[2,3]。

目前防治马铃薯干腐病的方法主要是在贮藏过程中保持干燥通风及以奥力克-霉止、多菌灵等农药消毒种薯, 但随之会产生病原菌抗药性、农药长时间残留、高毒性、高污染等问题^[4,5]。因此开发环境友好、作用方式特异、对非靶标生物相对安全等特点的植物源农药倍受人们的关注^[6,7]。

北细辛又名辽细辛, 为马兜铃科细辛属多年生药用植物, 除具有解热、镇静、镇痛等药效外^[8], 还有良好的杀虫作用和一定的抗菌活性^[9-11]。近年来研究表明, 北细辛独特的药理作用, 主要与其挥发油有关^[12]。北细辛挥发油对灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*

收稿日期: 2014-12-19 接受日期: 2015-03-19

基金项目: 黑龙江省教育厅科学技术研究项目 (12531030); 哈尔滨市科技局科技创新人才研究专项 (2012RFLXN003); 国家自然科学基金 (31201470); 黑龙江省留学归国科学基金项目 (LC2011008)

* 通讯作者 Tel: 86-451-55190866; E-mail: xiujuwu@neau.edu.cn

Pers.)等5种黄瓜致病菌、茄子黄萎病致病菌大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae* Kleb)、4种人参致病菌均有良好的抑制效果^[13-15]。作为植物源农药,北细辛具有一定的开发应用前景。

本试验探究了北细辛挥发油对5种马铃薯干腐病致病菌镰刀菌的抑菌效果,以期为马铃薯干腐病的有效防治和基于北细辛的植物源农药开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试植物北细辛(辽细辛)购于黑龙江省药材市场,经黑龙江省中医药大学王振月教授鉴定为马兜铃科细辛属北细辛。供试菌种为引起马铃薯干腐病的5种病原菌,分别为拟枝孢镰刀菌(*Fusarium sporotrichioides*)、拟丝孢镰刀菌(*F. trichothecioides*)、黄色镰刀菌(*F. culmorum*)、燕麦镰刀菌(*F. avenaceum*)、茄病镰刀菌蓝色变种(*F. solani* var. *coeruleum*)。5种病原菌均由东北农业大学李凤兰老师提供,保存于本实验室。

供试培养基为PDA培养基和VBC培养基。

1.2 方法

1.2.1 挥发油的提取

北细辛全株阴干,用粉碎机粉碎后过40目筛,放在通风干燥处备用。称取100g粉末,以1:10的料液比加入1000mL蒸馏水,超声辅助浸提60min后,用水蒸气蒸馏法提取挥发油,重复3次,挥发油提取率为2.1%。挥发油置于4℃冰箱保存备用。

1.2.2 菌种的活化

将保存在4℃的5种镰刀菌于室温下恢复几分钟,然后挑取少量菌丝接种于PDA培养基上,并置于25~28℃恒温培养箱中培养,待用。

1.2.3 挥发油对菌丝生长活性的抑制作用

采用菌丝生长速率法,用适量吐温60溶解挥发油后,加入到PDA培养基中,配成质量浓度为1.0、0.5、0.25、0.125、0.0625、0.0313g/L的培养基,以等体积的吐温60作为对照(CK),充分摇匀后,倒入培养皿中制成平板。待凝固后,每个平板中央接入1个直径0.5cm的菌饼,每一菌种、每个梯度设3个重复。然后置于25~28℃的恒温培养箱中培养,96h后采用十字交叉法测菌落直径,取平均值,按下式计算菌丝抑制率。

菌丝抑制率(%)=(对照组菌落直径-处理组

菌落直径)/(对照组菌落直径-0.5)×100%

以菌丝抑制率为横坐标,挥发油质量浓度为纵坐标,绘制毒力回归方程,并计算得出半抑制浓度IC₅₀。

1.2.4 挥发油对镰刀菌孢子萌发的抑制作用

以VBC培养基诱导产生大量孢子,采用凹玻片法测定孢子的萌发率。具体做法是取在VBC培养基上培养6~7d的镰刀菌,以无菌水将孢子冲洗下,用4层纱布过滤,将滤液充分摇匀制成孢子悬浮液,调节其浓度,在10×10低倍镜下观察,每个视野50~60个孢子。用少量吐温60溶解挥发油,与孢子悬液混合配成质量浓度分别为0.1、0.2、0.4、0.8g/L的孢子悬液,以无菌水作为空白对照。在凹玻片上分别滴入1滴含不同质量浓度挥发油的孢子悬浮液。将凹玻片放在一个含有吸水滤纸的培养皿中,置于25~28℃培养箱中,12h后镜检,观察孢子萌发情况,统计100~150个孢子,每个处理重复3次。按下列公式计算孢子萌发率和孢子抑制率。

孢子萌发率(%)=萌发孢子数/总孢子数×100%

孢子抑制率(%)=(对照组萌发率-处理组萌发率)/对照组萌发率×100%

以孢子抑制率为横坐标,挥发油质量浓度为纵坐标,绘制毒力回归方程,并计算得出IC₅₀。

1.2.5 地上部分和地下部分挥发油的提取

分别以水蒸气蒸馏法和超声辅助浸提法对北细辛地上部分和地下部分进行挥发油的提取,获得A(地上部分水蒸气蒸馏法)、B(地下部分水蒸气蒸馏法)、C(地上部分超声辅助浸提法)和D(地下部分超声辅助浸提法)等4组挥发油。每次称取50g植株粉末,每组设3次重复。挥发油经无水硫酸钠干燥后,以安捷伦7890A-5975c气相色谱-质谱联用仪进行GC-MS分析。GC-MS分析条件参照李凡海等^[16]。

1.3 数据分析

应用SPSS 17.0统计分析软件对试验数据进行方差分析,并进行Duncan's多重比较。

2 结果与分析

2.1 挥发油对5种镰刀菌菌丝生长的影响

采用二倍稀释法设置浓度梯度,考察不同浓度挥发油对5种镰刀菌菌落直径的抑制作用。由表1可以看出,0.0313~1g/L的挥发油均可抑制供试镰

刀菌的菌落直径,抑制效果随挥发油质量浓度的升高而增加。与对照(不加挥发油)相比,当挥发油浓度为0.0313 g/L时,对供试镰刀菌菌落直径的抑制作用均达极显著水平($P < 0.01$)。可见,北细辛挥发油对供试镰刀菌有良好的抑制作用。

由表1可知,随着质量浓度的增加,北细辛挥发油对5种镰刀菌菌丝生长的抑制作用明显增强。通过5个线性毒力回归方程($y = ax + b$),得出半抑制浓度(IC_{50})均小于0.5 g/L,说明北细辛挥发油对5种供试镰刀菌菌丝生长均具有较强的抑制作用。比

较半抑制浓度 IC_{50} , 燕麦镰刀菌 < 黄色镰刀菌 < 拟丝孢镰刀菌 < 拟枝孢镰刀菌 < 茄病镰刀菌蓝色变种。其中,对燕麦镰刀菌 IC_{50} 为0.148 g/L,说明挥发油对燕麦镰刀菌菌丝生长的抑制效果最显著;其次为对黄色镰刀菌、拟丝孢镰刀菌和拟枝孢镰刀菌, IC_{50} 在0.228 ~ 0.333 g/L;对茄病镰刀菌蓝色变种菌丝生长的抑制作用最弱, IC_{50} 为0.387 g/L。当挥发油质量浓度为1 g/L时,对燕麦镰刀菌、黄色镰刀菌具有杀菌的作用。

表1 挥发油对5种镰刀菌菌丝生长的抑制作用

Table 1 Inhibitory effects of essential oil on the mycelial growth of five *Fusariums*

菌种 Strain	不同浓度挥发油对菌丝生长的抑制率 Inhibition rate of different concentrations of essential oil on mycelial growth (g/L)						毒力回归方程 Regression equation of Virulence	IC_{50} (g/L)
	0.0313	0.0625	0.125	0.25	0.5	1		
茄病镰刀菌蓝色变种 <i>F. solani</i> var. <i>coeruleum</i>	14.55 ± 2.15	18.18 ± 1.89	21.82 ± 3.25	41.82 ± 2.03	65.45 ± 2.05	94.55 ± 3.52	$y = 0.011x - 0.163$ $r^2 = 0.969$	0.387
黄色镰刀菌 <i>F. culmorum</i>	20.93 ± 1.59	30.23 ± 2.73	41.86 ± 1.42	53.49 ± 0.97	81.40 ± 1.54	-	$y = 0.008x - 0.172$ $r^2 = 0.977$	0.228
燕麦镰刀菌 <i>F. avenaceum</i>	27.45 ± 1.24	33.33 ± 3.58	45.10 ± 1.74	60.78 ± 3.21	88.24 ± 1.98	-	$y = 0.007x - 0.202$ $r^2 = 0.988$	0.148
拟丝孢镰刀菌 <i>F. Trichothecioi-des</i>	13.04 ± 1.12	26.09 ± 1.12	34.78 ± 2.31	53.62 ± 0.12	71.01 ± 1.21	100.00 ± 0.00	$y = 0.011x - 0.228$ $r^2 = 0.934$	0.322
拟枝孢镰刀菌 <i>F. Sporotrichioi-des</i>	12.07 ± 1.02	25.86 ± 1.46	34.48 ± 3.27	51.72 ± 1.54	72.41 ± 1.23	100.00 ± 0.00	$y = 0.011x - 0.217$ $r^2 = 0.934$	0.333

注:“x”代表抑制率,“y”代表挥发油浓度,“-”表示杀菌。

Note:“x” represents the inhibition rate,“y” represents concentration of essential oil,“-” represents bactericidal effect.

2.2 挥发油对5种镰刀菌孢子萌发的影响

由表2可知,北细辛挥发油对5种镰刀菌孢子萌发均有明显的抑制作用,除茄病镰刀菌蓝色变种外,对其它4种镰刀菌的 IC_{50} 均小于0.5 g/L。随着挥发油浓度的增加,萌发率减小,抑制率增加。比较

半抑制浓度 IC_{50} , 燕麦镰刀菌 < 拟枝孢镰刀菌 < 黄色镰刀菌 < 拟丝孢镰刀菌 < 茄病镰刀菌蓝色变种,说明挥发油对燕麦镰刀菌孢子萌发的抑制效果最好。

表2 挥发油对5种镰刀菌孢子萌发的抑制作用

Table 2 Inhibitory effects of *A. heterotropoides* essential oil on the germination of *Fusarium* spores

菌种 Strain	浓度 Concentration (g/L)	萌发率 Germination rate (%)	抑制率 Inhibition rate (%)	毒力回归方程 Regression equation of Virulence	IC_{50} (g/L)
茄病镰刀菌蓝色变种 <i>F. solani</i> var. <i>coeruleum</i>	0.1	82.22 ± 0.34	2.70 ± 0.14		0.700
	0.2	69.46 ± 2.31	17.80 ± 1.23	$y = 0.014x$	
	0.4	56.53 ± 1.50	33.10 ± 1.68	$r^2 = 0.950$	
	0.8	39.97 ± 1.42	52.70 ± 1.78		
	CK	84.50 ± 3.21			
黄色镰刀菌 <i>F. culmorum</i>	0.1	82.09 ± 2.53	12.30 ± 1.23		0.413
	0.2	77.88 ± 2.13	16.80 ± 2.41	$y = 0.008x + 0.013$	
	0.4	44.74 ± 1.32	52.20 ± 1.52	$r^2 = 0.980$	
	0.8	8.80 ± 1.09	90.60 ± 2.23		

	CK	93.60 ± 2.87			
燕麦镰刀菌 <i>F. avenaceum</i>	0.1	85.60 ± 2.12	14.40 ± 1.35		0.336
	0.2	64.50 ± 4.11	35.50 ± 2.24	$y = 0.008x - 0.064$	
	0.4	35.70 ± 2.13	64.30 ± 1.87	$r^2 = 0.969$	
	0.8	0.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00		
	CK	100.00 ± 0.00			
拟丝孢镰刀菌 <i>F. trichothecoides</i>	0.1	89.10 ± 3.32	10.90 ± 1.21		0.480
	0.2	80.20 ± 1.32	19.80 ± 1.43	$y = 0.01x - 0.020$	
	0.4	51.10 ± 2.32	48.90 ± 3.21	$r^2 = 0.976$	
	0.8	21.70 ± 1.56	78.30 ± 4.21		
	CK	100.00 ± 0.00			
拟枝孢镰刀菌 <i>F. sporotrichioides</i>	0.1	72.01 ± 1.23	21.30 ± 3.35		0.393
	0.2	59.57 ± 1.87	34.90 ± 1.43	$y = 0.012x - 0.207$	
	0.4	37.06 ± 2.12	59.50 ± 3.53	$r^2 = 0.917$	
	0.8	22.33 ± 1.12	75.60 ± 1.45		
	CK	91.50 ± 0.97			

注：“x”代表抑制率，“y”代表挥发油浓度。

Note: “x” represents the inhibition rate, “y” represents concentration of essential oil.

2.3 不同提取方法下地上部分和地下部分挥发油提取率的比较

采用水蒸气蒸馏法和超声辅助浸提法分别对地上部分和地下部分挥发油进行提取,每次称取 50 g

样品,每组设 3 次重复,结果如表 3 所示。可知,地下部分挥发油含量明显高于地下部分,且超声辅助浸提法提取率更高,而且出油很快,大大缩短了提取时间,从而节省了工艺时间。

表 3 四组挥发油提取率的比较

Table 3 Comparison of extraction rates of 4 groups of essential oils

提取部位 Extraction part	提取方法 Extraction method	样品质量 Sample mass (g)	挥发油体积 Volume of essential oil (mL)			提取率 Extraction rate (%)
地上部分 Aerial part	水蒸气蒸馏法 Steam distillation	50	0.78	0.74	0.81	1.55 ± 0.07
	超声辅助浸提法 Ultrasonic - assisted extraction		0.82	0.98	1.10	1.93 ± 0.28
地下部分 Underground part	水蒸气蒸馏法 Steam distillation		1.32	1.13	1.29	2.49 ± 0.20
	超声辅助浸提法 Ultrasonic - assisted extraction		1.54	1.49	1.44	2.98 ± 0.10

2.4 GC-MS 分析结果

各取 4 种北细辛挥发油 1 μL 注入 GC-MS 联用仪进行分析,得到 4 个总离子流色谱图,见图 1。通过检索 NIST 05 标准谱库,并结合质谱裂解规律进行核对,共鉴定出 51 种成分,并采用峰面积归一法计算各化学成分的相对含量,结果见表 4。

其中,地上部分水蒸气蒸馏法挥发油中分离出 74 个化学成分,鉴定了 32 个成分,已鉴定成分占挥发油总量的 96.081%;地下部分水蒸气蒸馏法挥发油中分离出 61 个化学成分,鉴定出 31 个成分,已鉴定成分占挥发油总量的 95.713%;地上部分超声辅

助浸提法挥发油中分离出 105 个化学成分,鉴定出 36 个成分,已鉴定成分占挥发油总量的 94.858%;地下部分超声辅助浸提法挥发油中分离出 42 个化学成分,鉴定出 28 个成分;已鉴定成分占挥发油总量的 98.374%。4 种挥发油中共有 18 种相同成分,其中包括甲基丁香酚、黄樟醚、3,4,5-三甲氧基甲苯、3,5-二甲氧基甲苯、优香芹酮等,分别占 4 种挥发油含量的 66.5%、81.54%、66.85%、85.44%。可见地下部分挥发油中主要成分比地上部分含量高。

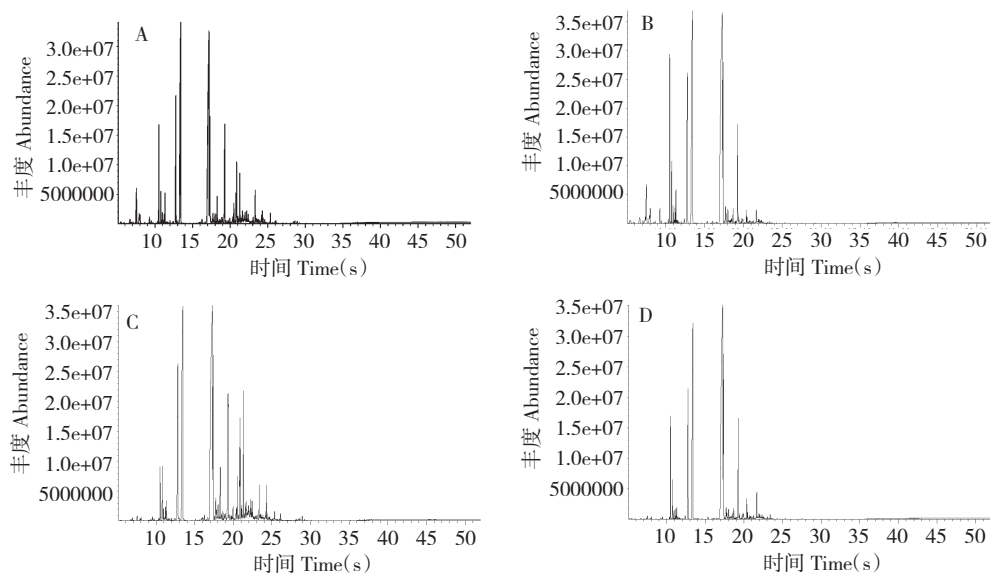


图1 地上部分水蒸气蒸馏法(A)、地下部分水蒸气蒸馏法(B)、地上部分超声辅助浸提法(C)及地下部分超声辅助浸提法(D)提取挥发油总离子流色谱图

Fig. 1 Total ion chromatograms of essential oils of aerial (A) or underground (B) part extracted by steam distillation and aerial (C) or underground (D) part extracted by ultrasonic-assisted extraction

表4 四组挥发油成分的GC-MS分析结果

Table 4 Chemical composition of four groups of essential oils

序号 No.	化学成分名称 Compounds	分子式 Formula	分子量 MW	相对含量 Content (%)				保留时间 Rt (min)
				A	B	C	D	
1	3-萜烯(3-Carene)	C ₁₀ H ₁₆	136.23	2.326	2.087	0.32	0.238	7.546
2	桉树脑(Cineole)	C ₁₀ H ₁₈ O	154.25	0.305	0.696	-	0.163	8.022
3	苯甲醛二甲缩醛(Benzaldehyde dimethyl acetal)	C ₉ H ₁₂ O ₂	152.19	-	-	0.068	-	9.731
4	樟脑((+)-Camphor)	C ₁₀ H ₁₆ O	152.23	0.247	0.266	0.137	0.148	10.364
5	优香芹酮(Eucarvone)	C ₁₀ H ₁₄ O	150.21	3.016	5.704	1.374	2.963	10.509
6	2-莰醇(L(-)-Borneol)	C ₁₀ H ₁₈ O	154.25	1.032	1.468	1.54	2.4	10.789
7	(-)-4-萜品醇((-)-4-Terpineol)	C ₁₀ H ₁₈ O	154.25	0.355	0.402	0.304	0.269	10.971
8	α-松油醇(alpha-Terpineol)	C ₁₀ H ₁₈ O	154.25	0.33	0.404	0.54	0.299	11.215
9	草蒿脑(Estragole)	C ₁₀ H ₁₂ O	148.25	0.915	0.815	0.543	0.321	11.339
10	环己烷(Cyclohexane)	C ₁₀ H ₁₆	136.23	-	-	-	0.051	11.635
11	香芹酚(Carvacrol)	C ₁₀ H ₁₆ O	152.23	-	-	0.151	-	11.794
12	2-异丙基-5-甲基茴香醚 (2-Isopropyl-5-methyl-Anisole)	C ₁₁ H ₂₆ O	174.32	-	0.064	0.133	-	12.009
13	3,5-二甲氧基甲苯(3,5-Dimethoxytoluene)	C ₉ H ₁₂ O ₂	152.19	7.057	9.011	8.153	7.267	12.798
14	黄樟醚(Safrole)	C ₁₀ H ₁₀ O ₂	162.18	20.456	22.709	18.566	18.305	13.440
15	丁香酚(Eugenol)	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	164.18	-	0.144	-	0.223	15.360
16	β-波旁烯(β-Bourbonene)	C ₁₅ H ₂₄	204.35	0.233	-	-	-	16.248
17	十四烷(Tetradecane)	C ₁₃ H ₂₈	184.36	-	-	0.132	-	16.715
18	甲基丁香酚(Methyl eugenol)	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	178.22	30.621	36.506	32.396	46.801	17.264
19	3,4,5-三甲氧基甲苯(3,4,5-Trimethoxytoluene)	C ₁₀ H ₁₄ O ₃	182.21	5.345	7.612	6.364	10.108	17.362

20	1-石竹烯(1-Caryophyllene)	C ₁₅ H ₂₄	204.35	0.58	0.377	0.495	0.393	17.379
21	原苯甲酸三甲酯(Trimethyl orthobenzoate)	C ₁₀ H ₁₄ O ₃	182.21	5.345	-	6.364	-	17.384
22	N-(2-乙氧基苯基)-N-(4-乙基苯基)-乙二酰胺 (N-(2-Ethoxyphenyl)-N-(4-ethylphenyl)-ethylene diamide;)	C ₁₈ H ₂₀ N ₂ O ₃	312.37	-	0.133	-	-	17.540
23	4-亚硝基-N,N-二乙基苯胺 (4-nitroso-n,n-Diethylaniline)	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O	178.23	-	-	0.166	-	17.552
24	白菖烯(Calarene)	C ₁₅ H ₂₄	204.35	-	0.628	-	0.122	17.721
25	α-蒎烯(α-Pinene)	C ₁₅ H ₂₄	204.35	0.257	-	0.165	-	17.773
26	长叶烯(Longifolene)	C ₁₅ H ₂₄	204.35	0.571	0.77	0.621	0.56	17.996
27	α-石竹烯(a-Caryophyllene)	C ₁₅ H ₂₄	204.35	1.994	1.056	2.46	1.079	18.266
28	3,4,5-三甲氧基苯甲酸(3,4,5-Trimethoxybenzoic acid)	C ₁₀ H ₁₂ O ₅	212.21	-	-	0.054	-	18.526
29	1-乙烯基环十二醇(1-ethenyl-Cyclododecanol)	C ₁₄ H ₂₆ O	210.35	-	-	0.098	-	18.832
30	环十三癸酮(Cyclotridecanone)	C ₁₃ H ₂₄ O	220.36	0.248	-	0.019	-	18.889
31	6-十三烯(6-Tridecene)	C ₁₃ H ₂₆	182.34	0.374	-	-	0.223	18.951
32	g-芸烯(g-Gurjunene)	C ₁₅ H ₂₄	204.35	-	0.126	-	-	19.065
33	正十五烷(n-Pentadecane)	C ₁₅ H ₃₂	244.47	5.95	3.186	8.049	4.161	19.257
34	α-布黎烯(α-Bulnesene)	C ₁₅ H ₂₄	204.35	-	0.242	-	0.272	19.418
35	(+)-花侧柏烯((+)-Cuparene)	C ₁₅ H ₂₂	202.33	0.171	-	0.048	-	19.444
36	β-甜没药烯(β-bisabolene)	C ₁₅ H ₂₄	204.35	-	-	0.033	-	19.496
37	α-杜松烯(α-Cadinene)	C ₁₅ H ₂₄	204.35	0.16	0.127	0.096	0.184	19.766
38	3,4,6-,三甲氧基苯甲酸 (3,4,5-Trimethoxybenzoic acid)	C ₁₀ H ₁₂ O ₅	212.21	-	0.173	-	-	19.880
39	反式苦橙油醇(D-nerolidol)	C ₁₅ H ₂₆ O	222.37	0.175	-	0.285	-	19.942
40	3,4-(亚甲基二氧)苯丙酮 (3,4-Methylenedioxypropiophenone)	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	178.18	-	0.167	-	0.525	19.947
41	顺式-α-红没药烯(cis-α-Bisabolene)	C ₁₅ H ₂₄	204.35	-	-	0.052	-	20.103
42	石竹烯氧化物((-)-Caryophyllene oxide)	C ₁₅ H ₂₄ O	220.35	2.438	-	0.047	-	20.310
43	榄香素(Elemicin)	C ₁₂ H ₁₆ O ₃	208.25	0.335	0.328	0.249	0.549	20.362
44	橙花椒醇(Nerolidol)	C ₁₅ H ₂₆ O	222.35	0.743	0.182	1.01	0.259	20.482
45	环丙甲醇(Cyclopropyl carbinol)	C ₁₂ H ₂₂ O	182.30	0.455	-	0.089	-	20.689
46	桉油烯醇((-)-Spathulenol)	C ₁₅ H ₂₄ O	220.35	1.048	0.084	-	0.206	20.772
47	香树烯(Alloaromadendrene)	C ₁₅ H ₂₄	204.35	-	0.118	-	-	20.855
48	卡枯醇(Kakoul)	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194.20	0.779	0.07	-	0.074	21.016
49	菝烯(Camphene)	C ₁₀ H ₁₆	136.23	0.259	-	-	-	21.099
50	百里香酚(Thymol)	C ₁₀ H ₁₄ O	150.21	-	0.058	0.04	-	21.151
51	环氧化蛇麻烯(Humuleneepoxide)	C ₁₅ H ₂₄ O	220.35	1.961	-	3.697	0.211	21.278
已鉴定物占总挥发油的百分含量(%)				96.081	95.713	94.858	98.374	

注:“-”表示未检出。

Note:“-” represents not detected.

3 讨论

由镰刀菌引发的马铃薯干腐病发病率高,危害严重。目前主要依靠化学农药进行防治。虽然防治效果显著,但病原菌极易产生抗药性,同时危害对人

类健康和环境。而植物源农药来源于植物,污染较小,易降解,使用效果好,是发展绿色农业的理想农药。但是相关研究主要集中在杀虫剂类,而对杀菌剂研究较少。因此,不断开发新的植物源杀菌剂成为当务之急。挥发油是植物源农药中研究比较广泛

一类化合物。已有报道细辛挥发油可以有效抑制番茄早疫病菌、茄子枯萎病菌等多种病菌^[17,18]。本研究发现北细辛挥发油对马铃薯干腐病致病菌镰刀菌的抑菌效果显著,且抑制作用与挥发油质量浓度呈剂量依赖性。说明北细辛挥发油可有效防治马铃薯干腐病,可将北细辛开发为植物源农药。

比较看来挥发油对供试菌丝生长与孢子萌发的抑制效果有所不同,孢子萌发的抑制试验中,抑制效果拟枝孢镰刀菌 > 黄色镰刀菌 > 拟丝孢镰刀菌,而在菌丝生长的抑制试验中,黄色镰刀菌 > 拟丝孢镰刀菌 > 拟枝孢镰刀菌。

挥发油 GC-MS 结果显示,其主要成分与前人研究大致相同^[16,19],其中甲基丁香酚含量最高。本研究发现地下部分超声辅助浸提法中甲基丁香酚的含量近于 50%,甲基丁香酚为北细辛主要的药用成分,其提取方法的优化对于提高北细辛的利用率具有重要意义。不同栽培技术、存放时间、产地、提取方法等对挥发油的有效成分均有所影响^[20]。4 组挥发油虽然有 18 种共同成分,但是其他成分及含量存在差异,说明提取方法及地上部分与地下部分所含成分不同所致。

本研究尚未对北细辛挥发油抑菌机制、4 种挥发油的抑菌活性比较进行系统性的探讨,对其抑菌活性成分也尚未明确。下一步将对北细辛挥发油作用后致病菌菌丝和孢子形态、生理生化指标以及致病菌基因和蛋白表达水平变化等方面进行深入研究,进一步阐明北细辛挥发油的抑菌机制,为北细辛挥发油的实际应用提供理论指导。

4 结论

以水蒸气蒸馏法对北细辛全株提取的挥发油对 5 种供试镰刀菌菌丝生长和孢子萌发均有较强的抑制作用,且抑制作用与挥发油质量浓度呈剂量依赖性。说明北细辛挥发油可有效抑制马铃薯干腐病镰刀菌,可进一步开发成为植物源农药。

采用水蒸气蒸馏法、超声辅助浸提法提取北细辛挥发油,通过 GC-MS 分析,鉴定出的成分占各挥发油的含量均达 94% 以上。初步鉴定出 51 种成分,其中地上部分水蒸气蒸馏法中 32 种,地下部分 31 种;地上部分超声辅助浸提法中 36 种,地下部分 28 种。

地下部分挥发油提取率高于地上部分,挥发油以甲基丁香酚和黄樟醚为主要成分,因此推测两种

物质为北细辛产生抑菌作用的有效成分。

参考文献

- Li YC, Bi Y, Ge YH, *et al.* Antifungal activity of sodium silicate on *Fusarium sulphureum* and its effect on dry rot of potato tubers. *J Food Sci*, 2009, 74: 213-218.
- Hou ZY (侯忠艳). Occurrence and control of dry rot of potato. *Mod Agric Sci Technol* (现代农业科学技术), 2012, 10: 173-179.
- Du M, Ren X, Sun QH, *et al.* Characterization of *Fusarium spp.* causing potato dry rot in China and susceptibility evaluation of Chinese potato germplasm to the pathogen. *Potato Res*, 2012, 55: 175-184.
- Li M (李梅), Tian SL (田世龙), Cheng JX (程建新), *et al.* Virulence and inhibition activity of three kinds of preservatives against the pathogen of the potato tuber dry rot. *Plant Protect* (植物保护), 2013, 39: 188-192.
- Cabanas R, Castella G, Abarca ML, *et al.* Thiabendazole resistance and mutations in the β -tubulin gene of *Penicillium expansum* strains isolated from apples and pears with blue mold decay. *FEMS Microbiol Lett*, 2009, 297: 189-195.
- Sun XC (孙现超), Peng JF (彭健芳), Zhang N (张宁), *et al.* Inhibitory effect and identification of an antagonistic actinomyces strain JY-22 against *Fusarium solani* causing potato dry rot. *Acta Phytophyl Sin* (植物保护学报), 2013, 40: 38-44.
- Han JY (韩俊艳), Sun CL (孙川力), Ji MS (纪明山). Recent advance of Chinese herb-*Asarum*. *Chin Agric Sci Bull* (中国农学通报), 2011, 27(9): 46-50.
- Zhu YL (朱跃兰), Hou XJ (侯秀娟), Zhao FM (赵凤毛). Research progress of *Asarum* application security use. *Chin Arch Tradit Chin Med* (中华中医药学刊), 2010, 28: 1175-1177.
- Han JY (韩俊艳), Wang J (王军), Han X (韩雪), *et al.* Effects of essential oil from *Asarum heterotropoides* on toxicity and related enzymes of *Tetranychus urticae*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2012, 24: 525-528.
- Dan Y, Liu H, Gao W, *et al.* Activities of essential oils from *Asarum heterotropoides* var. *mandshuricum* against five phytopathogens. *Crop Prot*, 2010, 29: 295-299.
- Ji LZ (姬兰柱), Wang GQ (王桂清), Liu Y (刘艳), *et al.* Effects of *Asarum* essential oils on physiological and biochemical indexes of two agricultural pest insects. *Guangdong Agric Sci* (广东农业科学), 2013, 8: 87-91.
- Wang XL (王晓丽). Recent advance of Chinese herb-*Asarum*. *Asia-Pacific Tradit Med* (亚太传统医药), 2013, 9(7): 68-71.