

剑叶龙血树树脂中的植物防卫素*

Q 949.718.2

王锦亮** 阮德春 程治英 周立刚 (中国科学院昆明植物研究所, 昆明 650204)

Phytoalexins in *Dracaena cochinchinensis* resin. Wang Jinliang, Ruan Dechun, Cheng Zhiying and Zhou Ligang (Kunming Institute of Botany, Academia Sinica, Kunming 650204) -Chin. J. Appl. Ecol., 1999, 10(2): 255~256

After the trunk of *Dracaena cochinchinensis* was separately inoculated with *Fusarium gramineum* var. *dracaena*, *F. gramineum* var. *yunnanensis* and *Cladosporium carpophilum* for 5~15 days, small red circles emerged around its inoculated positions and gradually enlarged with increasing days, and the redness also gradually became deep. Antifungal experiment and HPLC analysis confirmed that 7, 4'-dihydroxyflavan, 7-hydroxy-4'-methoxyflavan and Loureirin A were the three phytoalexins which were extracted and identified from the red xylems.

Key words Dragon's blood resin, *Dracaena cochinchinensis*, Phytoalexins.

1 引言

剑叶龙血树(*Dracaena cochinchinensis*)系龙舌兰科龙血树属,常绿乔木或灌木,在云南主要分布于勐连、勐腊、思茅、普洱、沧源、景东等县。在广西也有分布。剑叶龙血树现已成为我国传统中药血竭的主要基源植物之一^[1]。近几年,对血竭化学成分、血竭树脂形成的机理以及血竭树脂的化学生态学进行了研究^[2,3],初步证明国产血竭是由禾谷镰刀菌龙血树变种(*Fusarium gramineum* var. *dracaena*)等真菌侵入剑叶龙血树树干后逐渐形成的。植物被致病菌侵染或外来刺激受伤后,便会产生防卫反应而形成相应的防卫素^[4-7]。本文仅对剑叶龙血树被禾谷镰刀菌等真菌感染后形成的植物防卫素作一报导,这也是从龙舌兰科龙血树属植物中得到的植物防卫素。

2 材料与方 法

2.1 供试菌种

禾谷镰刀菌龙血树变种、禾谷镰刀菌云南变种(*Fusarium gramineum* var. *yunnanensis*)和枝孢嗜果疮霉(*Cladosporium carpophilum*)3个,菌种发酵液的制备见江东福等^[2]。

2.2 接种和提取

在勐连县城郊石灰岩山坡上选自然生长的大树3株,用注射器将上述3种菌种发酵液分别接种于龙血树枝条上(接种前取样,作为原始对照),每棵大树接种各菌种30~40个点(次),3次重复。对照为清水。接种前取样作为原始对照,接种后5、10、15d取样观察,每次取样10~12个点(次)。样品从枝条上切下后切碎晒干,称取切碎的样品6~9g,用索氏抽提器加入250ml甲醇回流提取8~10h,减压浓缩至干,过硅胶柱(10g),用100ml氯仿洗脱、浓缩,甲醇定容待测定。提取和测定重复2次。

2.3 标样化合物

7,4'-二羟基黄酮,7-羟基-4'-甲氧基黄酮和 Loureirin A 从中

国科学院西双版纳热带植物园药厂1990年3月出产由剑叶龙血树树脂为原料的云南雨林牌血竭中分离得到

2.4 HPLC 分析测定

色谱条件:色谱柱 N-18 chromatopackings center 4、150mm;流动相 甲醇:水 = 7:3;流速 0.4ml·min⁻¹;波长 280nm,定量方法为外标法。标准曲线:称取标样化合物 1、2 和 3 为 0.995、1.07、1.01mg·min⁻¹,分别用微量注射器吸取 1.300、2.100 和 3.300μl 置于 10μl 容量瓶内,用甲醇定容后,分别称取上述混合标物 5、10、15、20、25μl 进行色谱测定,数据处理机设定峰面积,以峰面积值为 Y 轴,以防卫素量为 X 轴作标准曲线,计算得到线性方程,3 个化合物分别为 Y = 1.00。

2.5 抗菌试验

在马铃薯培养基中接入枝孢嗜果疮霉菌,制成平板。在琼脂营养培养基上分别接入禾谷镰刀菌龙血树变种和禾谷镰刀菌云南变种制成平板,用灭菌的滤纸片沾取 2.5% 浓度的待测样品分别放入不同菌种的培养皿中,在 28℃ 下放置 2~3d,以空白滤纸片作对照,测量抑菌圈的大小(以 mm 为单位)。

3 结果与讨论

3.1 防卫素含量变化

禾谷镰刀菌龙血树变种、禾谷镰刀菌云南变种及枝孢嗜果疮霉 3 个菌种分别接种于龙血树树干后,第 3 天观察到受伤部位的周围出现略带红色的小圈,5d 后这个小圈呈鲜红色,10 和 15d 后这个红色小圈逐渐扩大,红色也逐渐加深,经石蜡切片并细胞学观察,在受伤外围细胞内开始现出着色深的颗粒,然后增多,10d 后这些着色颗粒开始聚集并逐步呈块状。又经 TLC 薄层检查,未接种的龙血树树干木质部的甲醇提取液与接种后 3、5、10、15d 的样品甲醇提取液比较,显示接种后提取液在薄层

* 国家自然科学基金(39170151)和云南省自然科学基金资助项目(97CO37Q)

** 通讯联系人。

1998-06-09 收稿,1998-10-18 接受

上化合物的数量明显增多.运用 HPLC 方法检查与 TLC 方法的结果一致.峰数明显增多.根据 HPLC 中的保留时间,其中 7,4-二羟基黄酮,7-羟基-4-甲氧基黄酮和 Loureirin A 3 个化合物在龙血树树干中从无到有,并且 5、10、15d 的含量逐步增加(表 1)此外,从对照部分也能测得上述 3 种化合物的含量.其含量也是增加趋势,只是其增加趋势要缓慢,含量要明显偏低,可以认为,产生原因与试验在自然林中进行有关,龙血树树干未作任何杀菌处理,因而注射器的机械损伤为树干上的真菌微生物提供了侵入的机会,这与自然环境中血竭形成相似.因此,它们也佐证了血竭形成与真菌侵入有关.

表 1 3 个化合物的含量变化

Table 1 Content of three compounds

| 菌名 Fungus | 天数 Days | 含量 Content (%) | | |
|--|------------|----------------------------------|---|-----------------------|
| | | 7,4-二羟基黄酮 7,4-dihydroxyflavan | 7-羟基-4-甲氧基黄酮 7-hydroxy-4-methoxyflavan | Loureirin A |
| 枝孢嗜果疮霉 <i>Cladosporium carpophilum</i> | 0 | - | - | - |
| | 5 | - | 4.89×10^{-5} | 8.75×10^{-5} |
| | 10 | 6.83×10^{-3} | 5.41×10^{-4} | 3.52×10^{-7} |
| | 15 | 7.74×10^{-3} | 1.06×10^{-2} | 7.37×10^{-4} |
| 禾谷镰刀菌 <i>F. gramineum</i> var. <i>druseana</i> | 0 | - | - | - |
| | 5 | - | 5.54×10^{-5} | 3.29×10^{-5} |
| | 10 | 1.82×10^{-3} | 1.57×10^{-4} | 1.97×10^{-4} |
| | 15 | 2.97×10^{-2} | 5.05×10^{-2} | 3.77×10^{-2} |
| 禾谷镰刀菌 云南变种 <i>F. gramineum</i> var. <i>yanmianensis</i> CK | 0 | - | - | - |
| | 5 | - | 2.20×10^{-5} | 1.64×10^{-5} |
| | 10 | 5.34×10^{-4} | 6.12×10^{-5} | 5.76×10^{-5} |
| | 15 | 7.06×10^{-4} | 9.10×10^{-5} | 6.29×10^{-4} |

表 2 3 个化合物的抗菌活性(抑菌圈直径 mm)

Table 2 Antifungal activity of three compounds

| 菌名 Fungus | 7,4-二羟基黄酮 7,4-dihydroxyflavan | 7-羟基-4-甲氧基黄酮 7-hydroxy-4-methoxyflavan | Loureirin A |
|--|---|---|-------------|
| | 枝孢嗜果疮霉 <i>Cladosporium carpophilum</i> | 15.0 | 10.1 |
| 禾谷镰刀菌 <i>Fusarium gramineum</i> var. <i>druseana</i> | 12.0 | 11.5 | 11.0 |
| 禾谷镰刀菌云南变种 <i>Fusarium gramineum</i> var. <i>yanmianensis</i> | 11.0 | 11.0 | 11.0 |

3.2 防卫素抗菌活性

3 个防卫素抗菌活性见表 2.综合上述结果,7,4-二羟基黄酮、7-羟基-4-甲氧基黄酮和 Loureirin A 应是剑叶龙血树受禾谷镰刀菌龙血树变种,禾谷镰刀菌云南变种以及枝孢嗜果疮霉感染后形成的植物防卫素,其化学结构如图 1 所示.

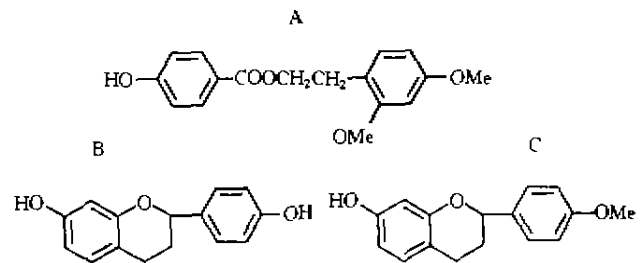


图 1 3 种化合物的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of three compounds.

A. Loureirin A, B. 7,4'-二羟基黄酮 7,4'-dihydroxyflavan, C. 7-羟基-4'-甲氧基黄酮 7-hydroxy-4'-methoxyflavan

致谢 所有光谱由中国科学院昆明植物研究所植化室仪器组测定,云南省微生物研究所温晓龙、江东福参加部分野外接种试验,一并致谢.

参考文献

- 1 王锦亮等. 1995. 云南血竭的化学成分及抗菌活性. 云南植物研究, 17(3):336~340.
- 2 江东福等. 1995. 龙血树真菌群及其对血竭形成的影响. 云南植物研究, 17(1):79~82.
- 3 蔡希陶、许再富. 1979. 国产血竭植物资源研究. 云南植物研究, 1(2):1~10.
- 4 Coxon, D. T., O'Neill, J. M., Mansfield, J. W. et al. 1980. Phytoalexins from *Daffodil bulbs*. *Phytochemistry*, 19:889~891.
- 5 Ghosal, S., Kumar, Y., Chakrabarti, D. K. et al. 1986. Parasitism of *Impatiens cylindrica* on *pancratium biflorum* and the concomitant chemical changes in the host species. *Phytochemistry*, 25(5):1097~1102.
- 6 Grayer, R. J., Harborne, J. B. 1994. A survey antifungal compounds from higher plants. *Phytochemistry*, 37(1):19~42.
- 7 Tverskoy, L., Dmitriev, A., Kozlovsky, A. et al. 1991. Two phytoalexins from *Allium cepa* bulbs. *Phytochemistry*, 30(3):799~800.

作者简介 王锦亮,男,1939年生,副研究员,主要从事植物与微生物(真菌)之间的化学生态学研究,已发表论文 30 多篇.

勘 误

本刊第 10 卷第 1 期第 41 页图 2 照片应倒置过来,敬请作者、读者见谅.

本刊编辑部