

# 柿子叶提取物对思茅松毛虫 肠道细菌抑制作用的研究

朱丽丽,刘绍雄,施蕊,王金华,思斯,熊智\*

(西南林业大学,西南山地森林资源保育与利用省部共建教育部重点实验室,云南昆明 650233)

**摘要:**以3龄和5龄的思茅松毛虫幼虫肠道细菌为供试菌种,采用牛津杯法测定柿子叶5种不同的提取物对思茅松毛虫肠道细菌的抑菌效果。结果显示:除柿子叶石油醚提取物对供试菌株没有抑制作用外,其余4种柿子叶提取物对供试菌株都有不同程度的抑制作用,且随着浓度的降低其抑制作用也降低,抑制作用大小顺序为乙酸乙酯提取物>氯仿提取物>乙醇提取物>正丁醇提取物,这四种柿子叶提取物对302号菌株都表现出了极强的抑制效果。因此,柿子叶提取物有作为良好的新型植物源生物农药进行开发利用的潜力。

**关键词:**柿子叶,提取物,思茅松毛虫,肠道细菌,抑菌作用

## Inhibition effect of *Ebenaceae Diospyroskaki* leaf extract on intestinal bacteria from instar larvae of *Dendrolimus kikuchii* Matsumura

ZHU Li-li, LIU Shao-xiong, SHI Rui, WANG Jin-hua, SI Si, XIONG Zhi\*

(Key Laboratory for Forest Resources Conservation and Use in the Southwest Mountains of China, Ministry of Education, Southwest Forestry University, Kunming 650233, China)

**Abstract:** Using 5th and 3th instar larvae of *Dendrolimu kikuchii* Matsumura as the tested strains, Oxford cup method was used to measure the inhibition effect of the 5 different extract from *Ebenaceae Diospyroskaki* leaf. The results showed that except petroleum ether of *Ebenaceae Diospyroskaki* leaf extract the other 4 different extract from extract had inhibition effect on *Dendrolimu kikuchii* Matsumura, and with the decreasing concentrations of its inhibition also reduced. Inhibition of order was Ethyl acetate extract > Chloroform extract > Ethanol extract > N-butyl alcohol extract, the four *Ebenaceae Diospyroskaki* leaf extract had a strong inhibition effect on 302 strains. *Ebenaceae Diospyroskaki* leaf extract could be used as the good new plant source biological pesticide to development and utilization.

**Key words:** *Ebenaceae Diospyroskaki* leaf; extract; *Dendrolimus kikuchii* Matsumura; intestinal bacteria; inhibition effect

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2013)07-0123-03

柿子属柿科(*Ebenaceae*)柿属(*Diospyros* L.f.)多年生落叶果树,原产我国,是我国五大水果(葡萄、柑桔、香蕉、苹果、柿子)之一<sup>[1]</sup>,具有很多可开发的优势。主要产地有陕西、河北、河南、山东、山西、北京和广西等省(市)。柿叶为柿科柿属植物柿(*Diospyros kaki* L.)的新鲜或干燥叶<sup>[2-3]</sup>。目前国内对外对柿子的研究主要集中在对柿果肉进行多种开发利用;柿子醇提取物的体外抗氧化研究<sup>[4]</sup>以及柿子多糖的水提醇沉工艺研究<sup>[5]</sup>,而在柿子叶抑菌方面的研究报道较少。思茅松毛虫 *Dendrolimus kikuchii* 属鳞翅目 *Lepidoptera* 枯叶蛾科 *Lasiolepididae* 松毛虫属 *Dendrolimus*, 该虫主要分布在云南、四川、湖南、湖北、

江西、江苏、安徽、浙江、广西、广东、福建、台湾、贵州等地,是我国南方松树的重要害虫<sup>[4]</sup>,也是我国30多种松毛虫中,危害最严重的6种松毛虫之一。昆虫肠道系统伴随取食、消化、排泄等活动,而昆虫肠道中栖息着大量的微生物,它们与寄主的营养生理活动有着密切的关系,影响着昆虫的生命活动<sup>[5]</sup>。昆虫肠道微生物的深入研究应用于害虫防治也具有广阔的前景。有报道指出,昆虫病原菌杀虫剂也是通过肠道微生物来发挥其作用的<sup>[6]</sup>。因此,肠道微生物抑菌作用研究将对于病虫害防治实践提供新的思路,目前鲜有相关研究报道。本研究以10株思茅松毛虫3龄和5龄幼虫肠道细菌为供试菌种,采用牛津杯法测定柿子叶提取物对思茅松毛虫肠道细菌的抑菌效果,为其进一步开发和利用提供依据,以及对思茅松毛虫病害的防治和新型植物源生物农药的开发具有理论意义。

### 1 材料与方法

收稿日期:2012-06-05 \*通讯联系人

作者简介:朱丽丽(1985-),女,硕士研究生,研究方向:果树生物技术。

基金项目:云南省森林灾害预警与控制重点实验室开放基金(KZ09A102);西南林业大学大型仪器设备共享平台资助。

表1 思茅松毛虫肠道细菌

Table 1 Intestinal bacteria from *Dendrolimu kikuchii* Matsumura

菌株编号	类型	寄主
501	雷金斯堡约克氏菌( <i>Yokenella regensburgei</i> )	5龄思茅松毛虫
502	产酸克雷伯氏杆菌( <i>Klebsiella oxytoca</i> )	5龄思茅松毛虫
504	克雷伯氏杆菌( <i>Klebsiella pneumoniae</i> )	5龄思茅松毛虫
506	苏云金芽孢杆菌( <i>Bacillus thuringiensis</i> )	5龄思茅松毛虫
510	弗氏柠檬酸杆菌( <i>Citrobacter freundii</i> )	5龄思茅松毛虫
301	巨大芽孢杆菌( <i>Bacillus megaterium</i> )	3龄思茅松毛虫
302	克雷伯氏杆菌( <i>Klebsiella pneumoniae</i> )	3龄思茅松毛虫
304	蜡状芽孢杆菌( <i>Bacillus cereus</i> )	3龄思茅松毛虫
310	苏云金芽孢杆菌( <i>Bacillus thuringiensis</i> )	3龄思茅松毛虫
306	产酸克雷伯氏杆菌( <i>Klebsiella oxytoca</i> )	3龄思茅松毛虫

## 1.1 材料与仪器

柿子叶于2012年4月10日采自云南昆明呈贡果园,经西南林业大学植物学教研室施蕊老师鉴定为柿科(*Ebenaceae*)柿属(*Diospyros* L.f.)多年生落叶果树的干燥叶片,将柿子叶洗净,风干粉碎(40目过筛);备用供试菌株思茅松毛虫3龄和5龄幼虫肠道细菌代表菌株由西南林业大学生命科学学院王金华副教授提供,菌株编号及其种属见表1。

95%乙醇、石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇、CMC-Na、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、蛋白胨、琼脂等均由昆明硕阳科技有限公司提供;NA培养基:CMC-Na 20g;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  2.5g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5g; 蛋白胨 2.5g; 琼脂 20g; 蒸馏水 1000mL; pH7.0~7.5。

RE-52A 旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; HH-2 数显恒温水浴锅 国华电器有限公司; BS-210S 电子天平 金羊天平仪器厂; 萃取仪 XH-100A型 北京祥鹤科技有限公司; 150AB 生化培养箱 上海树立仪器仪表公司。

## 1.2 实验方法

1.2.1 柿子叶提取液的制备 称取处理好的柿子叶干粉100g,以1:5(质量/体积)的比例加入95%的乙醇,72℃水浴回流提取3次,每次2h,合并滤液,70℃旋蒸直至提取物浓缩至膏状物并且重量不再变化为止,用无菌水将膏状物配50mg/mL的母液,将浸膏用水悬浮分散,依次加入等体积的用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇和氯仿各萃取3次,减压浓缩得萃取物石油醚、乙酸乙酯、正丁醇和氯仿4部分,70℃旋蒸直至萃取液浓缩成浸膏,用无菌水将浸膏配50mg/mL的母液,4℃冰箱保存、待用。

1.2.2 梯度浓度提取液的配制 将柿子叶提取母液用无菌水分别稀释成50、25、12.5、6.25、3.125mg/mL 5个浓度梯度,无菌水为对照(CK)。

1.2.3 抑菌实验 取100 $\mu\text{L}$ 菌液均匀涂布于固体培养基上,在固体培养基中放置不锈钢牛津杯(直径为6mm),加入200 $\mu\text{L}$ 不同质量浓度的柿子叶提取物,每种处理设3个重复,取平均值,至28℃恒温培养箱中培养24h,测其抑菌圈直径。

## 2 结果与分析

### 2.1 柿子叶乙醇提取物抑菌效果

图1表明,柿子叶乙醇提取物对这十株供试菌株都有一定的抑制作用,且随着提取物浓度的降低其抑制作用也降低。对302号克雷伯氏杆菌的抑制最强,对502号产酸克雷伯氏杆菌的抑制效果最弱,对302号克雷伯氏杆菌的最低抑制浓度为3.125mg/mL,对510号弗氏柠檬酸杆菌、301号巨大芽孢杆菌、304号蜡状芽孢杆菌及306号产酸克雷伯氏杆菌的最低抑制浓度为6.25mg/mL;对501号雷金斯堡约克氏菌、502号产酸克雷伯氏杆菌、504号克雷伯氏杆菌、506号苏云金芽孢杆菌及310号苏云金芽孢杆菌的最低抑制浓度为12.5mg/mL。

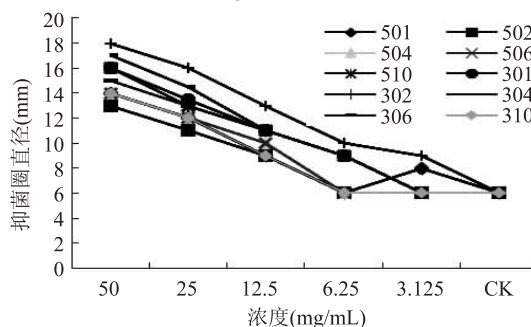


图1 柿子叶乙醇提取物抑菌效果

Fig.1 Antibacterial effect of ethanol extract from *Ebenaceae Diospyros kaki* leaf

### 2.2 柿子叶氯仿提取物抑菌效果

图2表明,柿子叶氯仿提取物对这十株供试菌株都有一定的抑制作用,且随着提取物浓度的降低其抑制作用也降低。对302号克雷伯氏杆菌的抑制作用最强,对504号克雷伯氏杆菌抑制作用最弱。对510号弗氏柠檬酸杆菌、302号苏云金芽孢杆菌及304号蜡状芽孢杆菌的最低抑制浓度为6.25mg/mL对501号雷金斯堡约克氏菌、502号产酸克雷伯氏杆菌、504号克雷伯氏杆菌、506号苏云金芽孢杆菌、301号巨大芽孢杆菌、306号产酸克雷伯氏杆菌、310号苏云金芽孢杆菌的最低抑制浓度为12.5mg/mL。

### 2.3 柿子叶乙酸乙酯提取物抑菌效果

图3表明,柿子叶乙酸乙酯提取物对这十株供试菌株都有一定的抑制作用,且随着提取物浓度的降低对其制作用也降低。对302号克雷伯氏杆菌抑

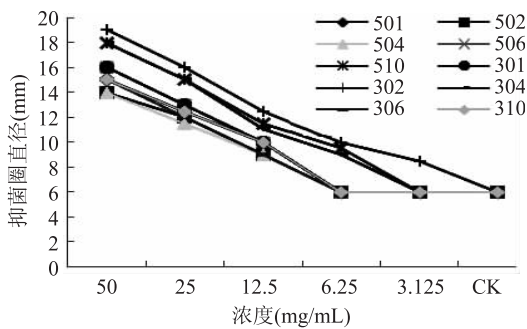


图2 柿子叶氯仿提取物抑菌效果图

Fig.2 Antibacterial effect of Chloroform extract from *Ebenaceae Diospyroskaki* leaf

制作用最强,对501号雷金斯堡约克氏菌抑制作用最弱。对501号雷金斯堡约克氏菌、502号产酸克雷伯氏杆菌及504号雷伯氏杆菌的最低抑制浓度为12.5mg/mL;对506号苏云金芽孢杆菌、510号弗氏柠檬酸杆菌、301号巨大芽孢杆菌、304号蜡状芽孢杆菌、306号产酸克雷伯氏杆菌及310号苏云金芽孢杆菌的最低抑制浓度为6.25mg/mL;对302号苏云金芽孢杆菌的最低抑制浓度为3.125mg/mL。

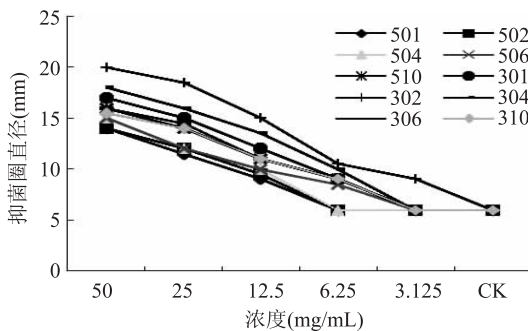


图3 柿子叶乙酸乙酯提取物抑菌效果图

Fig.3 Antibacterial effect of Ethyl acetate extract from *Ebenaceae Diospyroskaki* leaf

## 2.4 柿子叶正丁醇提取物抑菌效果

图4表示,柿子叶正丁醇提取物对这十株供试菌株都有一定的抑制作用,且随着提取物浓度的降低对其制作用也降低。对302号克雷伯氏杆菌的抑制作用最强,对501号雷金斯堡约克氏菌的抑制作用最弱。对502号产酸克雷伯氏杆菌、504号雷伯氏杆菌及510号弗氏柠檬酸杆菌的最低抑制浓度为均为50mg/mL;对506号苏云金芽孢杆菌及301号巨大芽孢杆菌的最低抑制浓度为25mg/mL;对501号雷金斯堡约克氏菌、302号苏云金芽孢杆菌、304号蜡状芽孢杆菌306号产酸克雷伯氏杆菌及310号苏云金芽孢杆菌的最低抑制浓度均为12.5mg/mL。

## 2.5 柿子叶石油醚提取物抑菌效果

柿子叶石油醚提取物对这十株供试菌株都没有明显的抑制作用。

## 3 结论与讨论

在这五种柿子叶提取物中,除乙醇提取物外,其余四种对这十株供试菌株都有不同程度的抑制作

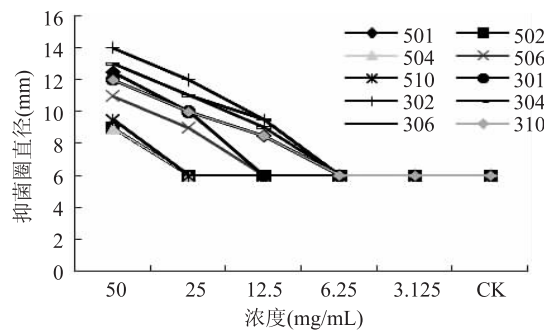


图4 柿子叶正丁醇提取物抑菌效果图

Fig.4 Antibacterial effect of N-butyl alcohol extract from *Ebenaceae Diospyroskaki* leaf

用,且随着浓度的降低其抑制作用也随之降低。

这四种柿子叶提取物对这十株供试菌株的抑制作用通过它们的抑菌圈直径平均值并按从大到小的顺序可排列为:乙酸乙酯柿子叶提取物 > 氯仿柿子叶提取物 > 乙醇柿子叶提取物 > 正丁醇柿子叶提取物。而且这四种柿子叶提取物对302号菌株都表现除了极强的抑制效果。

昆虫肠道中存在着大量的正常微生物,在抵御外来菌的侵入与定殖、促进免疫等方面起着重要作用<sup>[7]</sup>。如果思茅松肠道菌群发生紊乱,对思茅松毛虫的正常生命活动定会造成影响,可能导致代谢紊乱而死亡,从而达到防治思茅松毛虫病害的效果。正如报道中指出,昆虫病原菌杀虫剂也是通过肠道微生物来发挥其作用的<sup>[8]</sup>。柿子叶因其含有大量的活性物质在抑菌方面有一定的开发利用价值。因此,用柿子叶提取物对松毛虫的肠道微生物做抑菌活性研究,可以为松毛虫的防治提供新的思路。

## 参考文献

[1]王军.牛心柿、橘蜜柿清汁的加工工艺研究[D].西安:陕西师范大学学报,2005.  
 [2]江维克,周涛.柿叶——一种具有巨大开发潜力的资源[J].贵阳中医学院学报,1997,19(2):52-53.  
 [3]江苏新医学院.中药大辞典(下)[M].上海:上海科技出版社,1986:15-27.  
 [4]徐胜龙,杨建雄.柿子醇提取物的体外抗氧化研究[J].食品科学,2008,29(4):131-134.  
 [5]赵盈,张海生,王立霞,等.柿子多糖的水提醇沉工艺研究[J].农产品加工,2010,12:26-28.  
 [6]姚守华,李续翠.黄花蒿(青蒿)的药用价值及开发应用[J].中国医学研究与临床,2005,3(7):58-59.  
 [7]侯陶谦.中国松毛虫[M].北京:科学出版社,1987:6-31.  
 [8]叶景阳,王存荣.松毛虫的危害与治理[J].国土绿化,2010,2:45-46.  
 [9]黄红英,邓斌,张晓军,等.青蒿中黄酮类化合物的提取及其抗氧化性研究[J].安徽农业科学,2009,37(7):3037-3039.  
 [10]相辉,黄勇平.肠道微生物与昆虫的共生关系[J].昆虫知识,2008,45(5):687-693.