

五倍子抑制番茄晚疫病原菌物质的提取分离与作用机理初步分析

黄海英¹, 郑海武¹, 李正英^{1,*}, 宋琳琳²

(1. 内蒙古农业大学职业技术学院, 内蒙古包头 014109;

2. 内蒙古赛学教育信息咨询有限公司, 内蒙古呼和浩特 010010)

摘要:以致病疫霉番茄晚疫病原菌为供试菌, 研究五倍子水提物及其分离纯化物的抑菌机制。对五倍子粗提液醇沉萃取物进行抑菌实验与结构解析, 并在后期通过扫描电镜与透射电镜观察, 结合电导率判定其抑菌机制。研究结果显示, 乙酸乙酯萃取相抑菌圈直径为(33.9 ± 0.4) mm, 显著($P < 0.05$)高于其它各萃取相。对乙酸乙酯萃取相进行柱层色谱分离, 得到一组抑菌圈直径达(36 ± 0.2) mm的单体流分, 显著($P < 0.05$)高于其它各组流分; 对此单体流分进行二次柱层色谱分离, 得到抑菌圈直径达(37.3 ± 0.2) mm的单体, 结构鉴定显示为鞣酸。扫描电镜与透射电镜观察显示, 五倍子鞣酸能使番茄晚疫病原菌孢子表面凹陷, 边缘轮廓清晰性下降, 内核皱缩显著, 对孢子结构造成一定破坏。五倍子鞣酸能改变番茄晚疫病原菌的细胞膜通透性, 其作用效果与浓度有关, 浓度越大作用效果越好。

关键词:五倍子, 提取物, 萃取相, 番茄晚疫病原菌, 抑菌机理, 鞣酸

Extraction and Isolation of Nutgall Against Pathogenic Bacteria of Tomato Late Pathogen and Preliminary Analysis of Its Mechanism

HUANG Hai-ying¹, ZHENG Hai-wu¹, LI Zheng-ying^{1,*}, SONG Lin-lin²

(1. Inner Mongolia Agricultural University, College of Vocational Technical Institute, Baotou 014109, China;

2. Inner Mongolia Sai Xue Educational Information Consulting Co., Ltd., Hohhot 010010, China)

Abstract: In this study, the pathogenic bacteria of tomato late pathogen was used as the test bacteria to study the mechanism of action of crude extract and purification of nutgall. Extraction, separation and structure analysis of crude extract of nutgall were carried out, and the results were observed by SEM and TEM, determined the action mechanism by the conductivity measurement. The results showed that: The diameter of bacteriostatic zone of ethyl acetate extraction was (33.9 ± 0.4) mm, which was significantly ($P < 0.05$) higher than other parts. Then a group of monomer flow fraction with diameter of (36 ± 0.2) mm was obtained by column chromatography of ethyl acetate extraction, which was significantly ($P < 0.05$) higher than that of other groups. A monomer with a diameter of (37.3 ± 0.2) mm was isolated by secondary column chromatography, and its structure was identified as tannic acid. The tannic acid against the pathogenic bacteria of tomato late pathogen was observed by SEM and TEM, the results showed that tannic acid from Chinese nutgall had dimpled the spore surface of the pathogenic bacteria of tomato late pathogen, the cell margins became less clear, the cell kernel was significantly shrunken, caused some damage to the cell structure. Tannic acid of Chinese nutgall could change the cell membrane permeability of pathogenic bacteria of tomato late pathogen, its effect was concerned in concentration, the higher of the concentration, the better effect the results would be.

Key words: nutgall; extracts; extract phases; tomato late blight; antibacterial mechanism; tannic acid

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2020)06-0071-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020.06.012

引文格式: 黄海英, 郑海武, 李正英, 等. 五倍子抑制番茄晚疫病原菌物质的提取分离与作用机理初步分析[J]. 食品工业科技, 2020, 41(6): 71-75.

番茄晚疫病原菌是由致病疫霉 (*Phytophthora infestans*) 所引起的主要番茄病害之一^[1]。这种植物病害对农业生产存在严重威胁^[2], 报道指出由该病引

起的番茄减产, 每年能够达到 20%~30%, 严重时达到 50%~80%, 甚至绝收^[3-4]。目前主要采用农业防治和化学药物来控制病害发生, 但是为了提高番茄

收稿日期: 2019-07-09

作者简介: 黄海英(1983-), 女, 硕士研究生, 讲师, 研究方向: 农产品加工及贮藏, E-mail: 675166509@qq.com。

* 通讯作者: 李正英(1964-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 农产品加工及贮藏, E-mail: lizhy2002lizhy@163.com。

基金项目: 校企合作资助项目(中药材抑制番茄早晚疫病课题)。

产量,从发病初期就开始使用各种化学药物^[5],这些化学药剂的不科学使用,对人体健康有一定的不利影响,甚至出现致癌、致畸和致突变等情况^[6]。目前也有研究显示,使用转基因抗病机制可防治番茄晚疫病发生^[7],但转基因危害不确定性使其在我国推广存在一定难度^[8]。绿色农业需求的不断扩张,使包括植物源杀菌在内的生物农药以其易降解、环境污染小、不易产生抗性、来源广泛、对人畜安全性高等优点逐渐成为研究热点^[9-11]。

耿昕颖等^[12]研究发现五倍子含有鞣质、黄酮、萜醌、没食子酸等有效成分,具有抗病毒、抗肿瘤、抗炎、抑菌、抗机体氧化等多种生物学功能。五倍子鞣质对白假丝酵母有很强的抑菌作用,通过改变其细胞形态结构,促使细胞死亡,对口腔、胃肠道的感染具有一定的预防作用^[13-14]。李敏^[15]发现五倍子提取液对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等7种常见的菌都有抑菌效果,尤其对革兰氏阳性菌的抑菌效果明显,但是未确定起主要抑菌效果的成分。我国五倍子资源丰富,为了充分利用五倍子资源及开发无污染的植物抗菌剂,本文研究了以市售的五倍子干燥果实为研究对象,对五倍子水提物的活性物质提取分离及鉴定,再对番茄晚疫病病原菌进行了抑菌机理初步分析,为探索新型植物源农药提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

五倍子 呼和浩特市京远大药房,干燥成熟的果实;番茄晚疫病原菌 内蒙古农业大学职业技术学院食品微生物实验室提供;PDA培养基 青岛高科园海博生物技术公司;戊二醛 国药集团化学试剂有限公司;其他试剂 均为国产分析纯。

LDZX-40型立式电蒸汽压力灭菌器 上海申安医疗器械厂;RE-52AAA型旋转蒸发器 上海嘉鹏科技有限公司;TGL-16G-A型离心机 上海暗亭仪器厂;FD-3型真空冷冻干燥机 北京博医实验仪器有限公司;500兆超导核磁共振谱仪 德国BRUKER公司;LEO1430VP型扫描电镜 日本电子有限公司;JEM100CX型透射电镜 日本电子有限公司;DDS-11A型数显电导率仪 上海雷磁新径仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 五倍子活性物质提取、分离与结构鉴定

1.2.1.1 五倍子粗提液 采用宋琳琳等^[16]的最佳提取条件,取一定量的五倍子用中药粉碎机粉碎,过60目筛。称取200g五倍子粉末,以水为溶剂,固液比为1:25 W/V,在90℃下浸提3h,浸提3次,合并滤液,经3000 r/min离心15 min,取上清液在50℃下真空浓缩,用水定容到100 mL,放于4℃冰箱备用。

1.2.1.2 醇沉实验 取1.2.1.1得到的五倍子粗提液100 mL于三角瓶中,再加入等体积的无水乙醇,使乙醇浓度为50%,用磁力搅拌器搅拌1 h,继续加入无水乙醇调至乙醇浓度为65%,用磁力搅拌器搅拌1 h,继续添加无水乙醇至浓度为80%,用磁力搅拌器搅拌1 h。避光静止14 h后离心(3000 r/min、15 min),分离沉淀与上清液,在温度为-80℃、压强

为30 kPa的条件下冷冻干燥3 d后得到醇沉物和醇溶物的冻干粉。然后分别取1 g冻干粉,溶于5 mL蒸馏水中,采用滤纸片法^[17]做抑菌试验。

1.2.1.3 萃取实验 将1.2.1.2中抑菌效果好的冻干粉100 g溶解于200 mL蒸馏水中,再参照宋琳琳等^[16]法进行五倍子抑菌活性物质的萃取分离,得到石油醚萃取相、三氯甲烷萃取相、乙酸乙酯萃取相、正丁醇萃取相及水相,再用滤纸片法测定各萃取相的抑菌圈大小并进行比较,得出具有最佳抑菌萃取相。

1.2.1.4 抑菌活性物质分离 参照郑署明等^[18]的方法,稍作改动。将1.2.1.3中的最佳抑菌萃取相真空冷冻干燥成粉末,取5 g干燥物进行硅胶(100~200目)柱层层析,首先以氯仿洗脱直至出现液体,再按氯仿:乙酸乙酯:甲醇体积比为100:1:1、80:1:1、60:1:1、40:1:1、20:1:1、10:1:1、1:1:1、1:10:2、1:10:4、1:10:6、1:10:8、1:10:10梯度洗脱,每组洗脱剂用量为200 mL,流速为1 mL/min,最后用200 mL甲醇洗脱,用自动收集仪每1 min收集一管流分,根据颜色变化共收集到27个流分,进行薄层层析,将 R_f 值相近的流分进行合并,得到六个流分,分别编号1~6号流分,把各流分进行真空浓缩(条件为65℃,浓缩至10 mL),再温度为-80℃、压强为30 kPa的条件下冷冻干燥3 d后得到粉末。然后用水溶解各个流分,浓度为0.2 g/mL,用滤纸片法比较各流分的抑菌圈直径,筛选出最佳抑菌流分并进行二次柱层析分离纯化,流动相采用氯仿:乙酸乙酯:甲醇,体积比为10:1:1、9:1:1、8:1:1、7:1:1、6:1:1、5:1:1、4:1:1、3:1:1、2:1:1、1:2:1、1:3:1、1:3:1、1:3:2、1:3:3、1:3:4、1:3:5、1:3:6、1:3:7、1:3:8、1:3:9、1:3:10梯度洗脱,每组洗脱剂用量为200 mL,流速为1 mL/min,用自动收集仪每1 min收集一管流分,最终以甲醇洗脱。根据颜色变化共收集到16个流分,进行薄层层析,将 R_f 值相近的流分合并,得到4个流分,分别编号7~10号流分。将各流分进行真空浓缩(条件为65℃,浓缩至10 mL),再在温度为-80℃、压强为30 kPa的条件下冷冻干燥3 d后得到晶体,并调制浓度为0.2 g/mL的流分液,进行抑菌试验,得出最佳抑菌流分。

1.2.1.5 结构鉴定 将1.2.1.4得到的最佳抑菌流分进行真空冷冻干燥,干燥物用甲醇溶解,溶液澄清透明,流动性很好,无气泡,满足结构鉴定的要求,本实验采用500 M超导核磁共振谱仪进行单体结构鉴定。

1.2.2 作用机制初步分析

1.2.2.1 扫描电镜观察 参照王慧^[19]的方法,稍作改动。将1.2.1.4确定的单体物质(鞣酸)晶体加入到孢子悬液中,使其浓度为0.2 g/mL,处理6 h后离心(3000 r/min、15 min)得到处理组菌体,以未加单体物质(鞣酸)晶体的孢子悬液为对照,分别加入2.5%戊二醛室温固定4 h后PBS缓冲液漂洗3次,再用1%钨酸固定6 h用PBS缓冲液漂洗3次。将固定好的菌泥用乙醇(乙醇浓度分别为30%、50%、70%、85%、95%)梯度洗脱各一次,100%乙醇洗脱2次,每次20 min。然后用乙酸异戊酯置换2次,每次

20 min, 然后结晶用真空管镀膜仪抽低真空干燥, 喷碳镀膜, 在扫描电镜下观察。

1.2.2.2 透射电镜观察 参照周立琴等^[20]的方法, 稍作改动。将 1.2.1.4 确定的单体物质(鞣酸)晶体加入菌悬液, 使其浓度为 0.2 g/mL, 处理 6 h 后离心(3000 r/min、15 min)得到处理组菌体, 以未用抑菌单体处理的菌体为对照组, 分别加入 2.5% 戊二醛室温固定 4 h 后 PBS 缓冲液漂洗 3 次, 3000 r/min 下离心 15 min, 滤渣用 1% 钼酸固定 6 h 用 PBS 缓冲液漂洗 3 次, 3000 r/min 下离心 15 min, 弃去上清液, 将固定好的菌泥用叔丁醇(叔丁醇浓度分别为 30%、50%、70%、85%、95%)梯度洗脱各一次, 100% 叔丁醇洗脱 2 次, 每次 20 min。然后用乙酸异戊酯置换 2 次, 每次 20 min。然后用 Epon818 树脂包埋固化切片。再用 3% 醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染色, 透射电镜观察。

1.2.2.3 对番茄晚疫病病原菌细胞膜通透性的影响 取 1.2.1.4 确定的单体物质(鞣酸)梯度稀释。方法为: 取 15 mL 鞣酸溶液浓度梯度, 分别加入 15 mL PDB 培养基, 使其终浓度分别为 125、62.5、31.2、15.6、7.8、0 mg/mL, 再分别加入 20 μ L 番茄晚疫病病原菌孢子悬液, 在 28 $^{\circ}$ C 的培养箱(150 r/min)中培养, 分别培养 0、1、2、4、8、16 h 后取 5 mL 离心(3000 r/min、15 min), 取上清液 1 mL 加入 19 mL 超纯水, 备用。用电导率测定仪测各组电导率。每组试验做三组平行。

1.3 数据处理

所得数据用 Excel 2010 和 SPSS 16.0 进行统计分析和作图。实验均重复三次, 以平均值(mean) \pm 标准偏差(standard deviation)来表示。

2 结果与分析

2.1 醇沉实验及萃取实验结果

通过上述 1.2.1.2 的方法对五倍子粗提液进行醇沉实验, 得出浓度为 0.2 g/mL 的醇沉物与醇溶物的抑菌圈直径分别为(13.8 \pm 0.4)、(26.6 \pm 0.3) mm, 以无水乙醇为空白实验, 得到抑菌圈直径为(8 \pm 0.3) mm。醇溶物抗菌能力显著($P < 0.05$)高于醇沉物, 这与关键等^[21]文中提到的五倍子醇提液中鞣质含量能达 6.43% 是一致的, 因此可断定五倍子中主要抗番茄晚疫病病原菌的物质为醇溶性物质。将醇溶性物质进一步萃取分离, 其抑菌结果如图 1, 石油醚萃取相不具有抑菌性, 三氯甲烷萃取相、乙酸乙酯萃取相、正丁醇萃取相、水相抑菌圈直径分别为(15.5 \pm 0.6)、(33.9 \pm 0.4)、(16.6 \pm 0.7)、(9.2 \pm 0.5) mm。乙酸乙酯萃取相的抗菌效果显著($P < 0.05$)高于其它各相。因此醇溶物中主要抑菌物质存在与乙酸乙酯萃取相。

2.2 抑菌成分分离

对乙酸乙酯萃取相作为待测的样品, 进行柱层析, 并得到六个流分, 分别编号 1、2、3、4、5、6, 对六个流分进行抑菌试验, 结果如图 2。各流分抑菌圈直径差异显著($P < 0.05$), 其中 5 号流分抗菌能力最强, 抑菌圈直径达到(36 \pm 0.2) mm, 6 号流分不具有抑菌

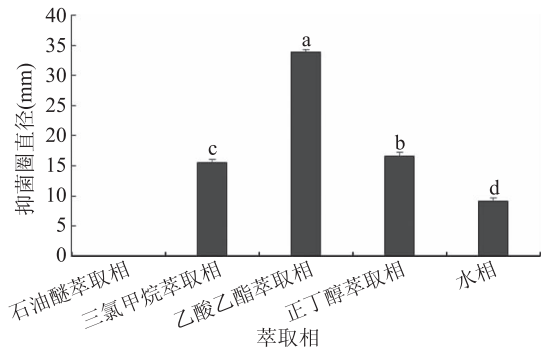


图 1 萃取物对提取液抑菌效果的影响

Fig.1 Effects of extractant on antifungal substances

能力, 1、2、3、4 各组流分抑菌圈直径均不足(20 \pm 0.3) mm。因此认为最佳抑菌成分存在于 5 号流分中。将 5 号流分进一步柱层色谱分离纯化, 得到 4 种流分分别编号 7、8、9、10。对四个流分进行抑菌实验, 结果如图 2。其中 9 号流分抑菌能力显著($P < 0.05$)高于其它, 抑菌圈直径为(37.3 \pm 0.2) mm。

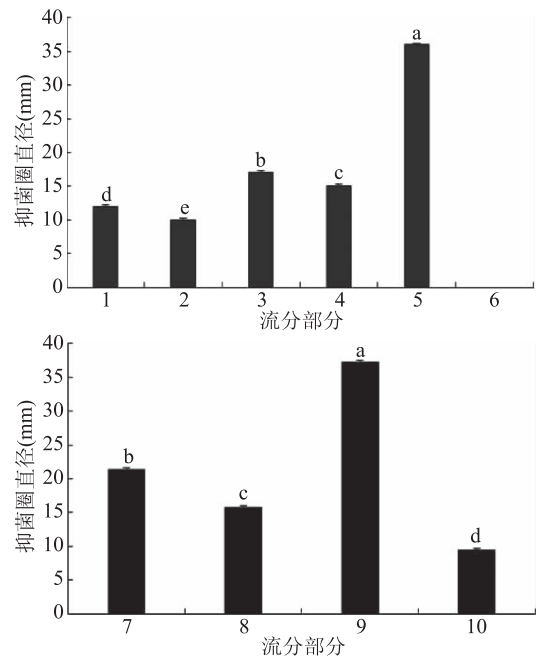


图 2 各流分对提取液抑菌效果

Fig.2 Effects of flowing of parts on antifungal substances

2.3 结构鉴定结果

9 号流分重结晶后为单一晶体, 将 9 号结晶用甲醇溶解, 采用 500 M 超导核磁共振波谱仪进行结构鉴定, 结果如图 3 和图 4。核磁共振是物理检测方法, 它提供的是分子中有关氢及碳原子的类型、数目、互相连接方式等信息。氢核磁共振($^1\text{H-NMR}$)信号峰是氢在外加磁场中吸收不同频率电磁波后产生的共振吸收峰。主要参数包括: 化学位移, 质子数; 偶合常数(J)等。根据俞文胜^[22]等的研究可知, 碳原子是形成大多数中药化学成分的基本物质, $^{13}\text{C-NMR}$ 可以提供碳原子的信息, 从而能确定该化合物的基本构架。

根据图 3 和图 4 可确定出该物质是分子式为 $\text{C}_{11}\text{H}_{32}\text{O}_6$ 的五个没食子酰基及一个 β 型吡喃葡萄糖残基。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Solvent) ppm: 6.97, 7.00,

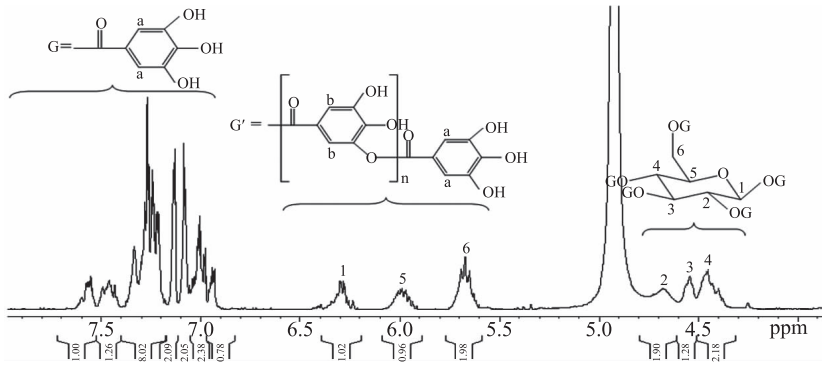


图3 9号流分的核磁共振氢谱

Fig.3 The extraction of 9 ¹H-NMR

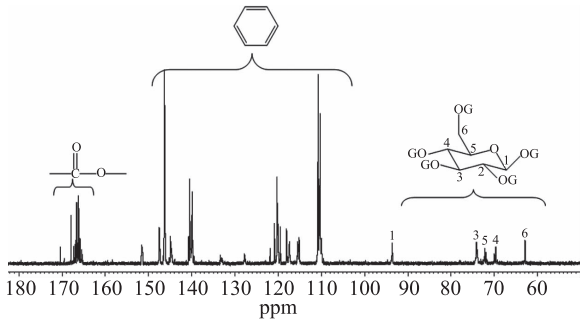


图4 9号流分的核磁共振碳谱

Fig.4 The extraction of 9 ¹³C-NMR

7.05, 7.08, 7.14 (各 2H, S, 没食子酰基氢)。β 型吡喃葡萄糖残基的 ¹H-NMR ppm: 6.28 (1H, d, J = 8.4), 5.62 (2H, d, J = 8.4, 9.5), 6.01 (3H, t, J = 9.5), 5.66 (4H, d, J = 9.5), 4.57 (6H, d, J = 1.7, 12.8)。¹³C-NMR (125 MHz, Solvent) ppm: 119.6 (C-1'), 138.9 (C-1'), β 型吡喃葡萄糖残基的 ¹³C-NMR ppm: C-1: 93.4 (S), C-2: 71.8 (S), C-3: 73.4 (S), C-4: 69.5 (S), C-5: 74 (S), C-6: 63.1 (S)。波普数据经与标准图谱^[23]图 5 对比后可确定此单体为鞣酸。

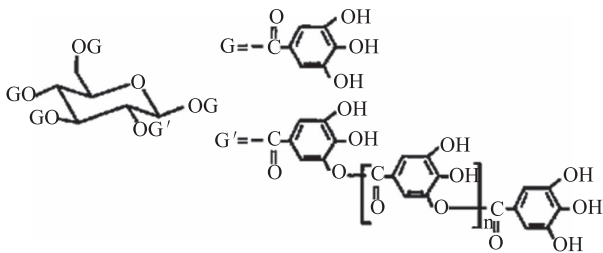


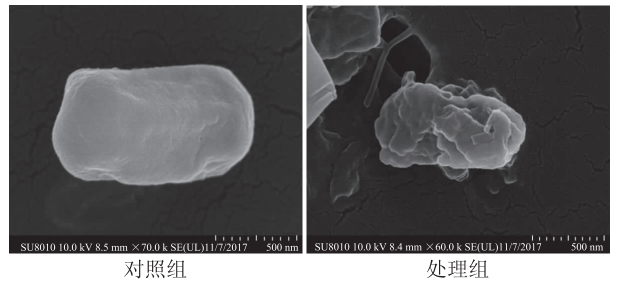
图5 中华药典中鞣酸的结构图

Fig.5 Tannic acid's structural formula

2.4 抗菌机理的初步分析结果

2.4.1 扫描电镜观察结果 从图 6 的扫描电镜结果可看出, 未经药液处理的菌体饱满且表面光滑层次分明, 细胞壁与细胞膜均处于完整状态; 经上述分离纯化的鞣酸处理后, 菌体出现表面被严重破坏, 细胞壁破损, 凹陷, 出现了断裂现象, 造成细胞质外泄, 菌体的严重破坏导致细胞不具有了传代能力。

2.4.2 透射电镜观察结果 从图 7 的透射电镜结果可看出, 未经鞣酸处理的对照组菌体状态, 细胞体完

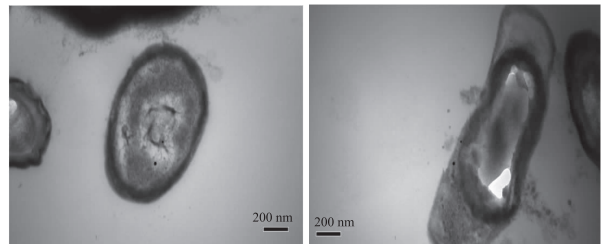


对照组

处理组

图6 鞣酸处理前后的扫描电镜图

Fig.6 SEM of tomato late blight fungal by tannic acid



对照组

处理组

图7 鞣酸处理前后的透射电镜图

Fig.7 TEM of tomato late blight fungal by tannic acid

整, 表面轮廓明显清晰细胞质均匀, 细胞内核饱满; 经过鞣酸处理后菌体轮廓出现模糊状态, 表面有小孔出现, 细胞内容物出现皱缩及外泄现象, 看不出完整结构体。

2.4.3 对番茄晚疫病原菌细胞膜通透性的影响结果

细胞膜作为细胞的自然屏障, 必须保持一定的稳定状态才能生存, 当遭受到外界一定干扰刺激时, 细胞膜通过改变其通透性来维持这种稳定, 当刺激超过细胞膜自身耐受性时, 细胞膜会遭到严重破坏导致细胞质大量外流, 细胞遭到刺激后, 细胞膜通透性改变使得细胞内电解质释放进入胞外溶液, 通过测定胞外溶液电导率的变化状况, 可判断药剂处理后细胞通透性的改变状况^[24-25], 孢子悬液的电导率变化越快, 表示电解质穿过细胞膜的速度越快, 细胞膜通透性越大, 电导率变化越大, 表明细胞受到的干扰与刺激越大^[26-27]。

由图 8 可看出, 鞣酸浓度越大细胞通透性越大。鞣酸浓度为 15.6 mg/mL 时, 1 h 后电导率不再有显著改变, 趋于稳定, 即 1 h 后鞣酸对细胞通透性的破坏不再扩大, 趋于稳定; 当浓度为 31.2 mg/mL 时, 电

导率在 1~2 h 稳定不变, 2 h 后出现增长, 即随着时间的增长在 2 h 后细胞膜出现了更大的破坏; 当鞣酸浓度为 62.5 mg/mL 时电导率 2 h 后趋于稳定; 当鞣酸浓度达到 125 mg/mL 时电导率改变速度较快且较大, 表明受到刺激与破坏较大。综上所述, 五倍子提取物中的主要成分鞣酸能有效破坏菌丝体细胞膜的通透性, 电解质大量渗透而使菌体死亡, 且浓度达到 125 mg/mL 时破坏力更强。

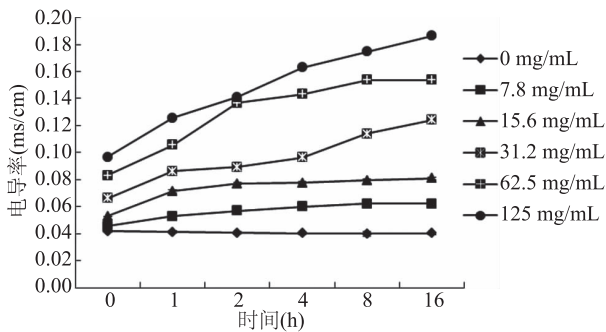


图8 五倍子鞣酸对番茄晚疫病病菌细胞膜透性的影响

Fig.8 Effect of extraction *Galla chinensis* on the membrane permeability of tomato late blight

3 结论

综合实验结果可以看出五倍子具有抑番茄晚疫病病原菌的潜在能力。五倍子粗提液醇提萃取后, 再经柱层色谱分析得出馏分 9 具有较强抗菌能力, 通过核磁共振检验出馏分 9 为鞣酸单体。对五倍子鞣酸进一步抗菌机理的初步研究时, 通过扫描电镜与透射电镜观察得出五倍子鞣酸处理使得细胞表面出现凹陷, 细胞边缘轮廓清晰性下降, 细胞内核皱缩显著, 能够对细胞结构造成了一定破坏。五倍子鞣酸能够改变番茄晚疫病病原菌的细胞膜通透性从而起到抑菌效果, 并且随着鞣酸浓度的增大, 细胞膜通透性改变不断加大。五倍子主要抑菌物质的初步分析进一步推进了五倍子作为生物防治手段用于抑治番茄晚疫病发生的可能。

参考文献

[1] Sanchez-Perez A, Halterman D, Jordan S, et al. RB, and Ph, resistance genes in potato and tomato minimize risk for oospore production in the presence of mating pairs of *Phytophthora infestans* [J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2017 (12): 1-12.

[2] Fry W. *Phytophthora infestans*: The plant (and R gene) destroyer [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2010, 9(3): 385-402.

[3] 周婷. 露地番茄晚疫病的发生与防治 [J]. *现代农村科技*, 2019(7): 24.

[4] Stroud J A, Shaw D S, Hale M D, et al. SSR assessment of *Phytophthora infestans*, populations on tomato and potato in British gardens demonstrates high diversity but no evidence for host [J]. *Plant Pathology*, 2016(65): 334-341.

[5] 卫刚果, 程耀民, 李辰, 等. 番茄晚疫病、病毒病的预防和防治 [J]. *新农业*, 2018, 4(7): 44-45.

[6] 郑海武, 李正英, 杨帆, 等. 中药抑制番茄晚疫病病原菌的配伍筛选及抑菌效果初步研究 [J]. *保鲜与加工*, 2019(2):

54-61.

[7] Hanson P, Lu S F, Wang J F, et al. Conventional and molecular marker-assisted selection and pyramiding of genes for multiple disease resistance in tomato [J]. *Scientia Horticulturae*, 2016, 201: 346-354.

[8] 郑海武, 李正英. 植物源抗番茄晚疫病病菌的研究进展 [J]. *食品工业科技*, 2016(23): 388-391, 396.

[9] Klaić R, Salletić R C, Souza A, et al. Biopesticide patents [J]. *Recent Patents on Engineering*, 2013, 7(3): 182-195.

[10] Hakala E, Hanski L L, Yrjönen T, et al. The lignan-containing extract of *Schisandra chinensis* berries inhibits the growth of *Chlamydia pneumoniae* [J]. *Natural Product Communications*, 2015, 10(6): 1001.

[11] Kang, Sang-Mo. Antimicrobial effects of Omija (*Schisandra chinensis*) flesh and seed extracts against human skin pathogens [J]. *Journal of The Korean Society of cosmetology* 2015, 21(3): 545-553.

[12] 耿昕颖, 刘蕾, 王家祯, 等. 醇提五倍子对鳙鱼非特异性免疫功能及抗病能力的影响 [J]. *上海交通大学学报: 农业科学版*, 2015, 33(6): 87-91.

[13] 韩文清, 马尚云, 刘宇杰, 等. 浅谈内蒙古杭锦后旗番茄晚疫病的发生危害与综合防治对策 [J]. *现代农业*, 2019(6): 42-43.

[14] 周劲光. 五倍子的药理作用与临床研究进展 [J]. *海峡药学*, 2010(4): 49-50.

[15] 李敏. 五倍子提取物抑菌效果及稳定性研究 [J]. *氨基酸和生物资源*, 2016, 38(3): 48-52.

[16] 宋琳琳, 李正英, 陈萍. 五倍子抗番茄晚疫病病原菌有效成分提取工艺研究 [J]. *食品工业科技*, 2013, 34(10): 269-271.

[17] 吴慧娟, 黄杨名, 陈科廷, 等. 神农香菊全草精油的化学成分及抑菌机理研究 [J]. *食品科学*, 2012, 33(17): 35-39.

[18] 郑曙明, 黄建军, 吴青, 等. 复方五倍子有效成分的分离鉴定及抑菌活性研究 [J]. *水生生物学报*, 2010, 34(1): 57-64.

[19] 王慧. 中药竹盐脱敏凝胶对于治疗牙本质过敏症疗效的实验研究 [D]. 济南: 山东大学, 2016.

[20] 周立勤, 王汉敏, 陈林娜, 等. 透射电镜下中药制剂对耐药菌株的抑菌作用观察 [J]. *湖北中医药大学学报*, 2006, 8(1): 13-16.

[21] 关键, 金哲雄. 鞣质提取方法的研究进展 [J]. *黑龙江医药*, 2012, 25(4): 539-541.

[22] 俞文胜, 陈新民, 杨磊, 等. 白藜单宁化学成分的研究 [J]. *天然产物研究与开发*, 1995(1): 15-18.

[23] 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典 (2000 年版一部) [M]. 北京: 北京化学工业出版社, 2000: 49-50.

[24] 张英. 根皮素抑菌活性及抑菌机理的研究 [D]. 西安: 陕西师范大学, 2016.

[25] 周凌霄, 杨荣华, 岳富浩. 芫荽的抗菌作用研究 [J]. *中国调味品*, 2001(3): 20-21, 32.

[26] Mao L, Wang G, Que F. Application of 1-methylcyclopropene prior to cutting reduces wound responses and maintains quality in cut kiwifruit [J]. *Journal of Food Engineering*, 2007, 78(1): 361-365.

[27] 周磊, 云宝仪, 汪业菊, 等. 大黄素对金黄色葡萄球菌的抑菌作用机制 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2011, 27(12): 1155-1159.