

## 喜树碱对黄瓜白粉病和霜霉病及水稻纹枯病的抑菌活性

张立钦, 孙逸钊, 王品维, 童森森, 马良进

(浙江林学院 林业与生物技术学院, 浙江 临安 311300)

摘要: 以喜树碱为原药, 进行农用杀菌剂的开发与研究。室内盆栽的活体实验研究结果表明: 喜树碱对水稻纹枯病 *Rhizoctonia solani*, 黄瓜白粉病 *Sphaerotheca fuliginea*, 黄瓜霜霉病 *Pseudoperonospora cubensis* 均有较高的杀菌活性, 半数致死质量浓度和 90%致死质量浓度分别为 41.964, 40.495, 27.489 mg·L<sup>-1</sup> 和 756.776, 247.026, 341.818 mg·L<sup>-1</sup>。同时, 黄瓜霜霉病的田间药剂试验结果表明, 喜树碱对霜霉病菌有杀菌活性, 其半数致死质量浓度和 90%致死质量浓度分别为 11.221 和 69.128 mg·L<sup>-1</sup>, 因此, 喜树碱可能成为有效的生物源杀菌剂。表 2 参 13

关键词: 植物保护学; 喜树碱; 水稻纹枯病; 黄瓜白粉病; 黄瓜霜霉病; 生物源杀菌剂

中图分类号: S432.4 文献标志码: A 文章编号: 1000-5692(2008)06-0681-04

## Antifungal activity of camptothecin on *Rhizoctonia solani*, *Sphaerotheca fuliginea* and *Pseudoperonospora cubensis*

ZHANG Li-qin, SUN Yi-zhao, WANG Pin-wei, TONG Sen-miao, MA Liang-jin

(School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

**Abstract:** Effectiveness of a naturally derived fungicide against *Rhizoctonia solani*, *Sphaerotheca fuliginea* and *Pseudoperonospora cubensis* was studied under greenhouse and field condition. In greenhouse, the cucumber (*Cucumis sativus*) seedlings, inoculated with the three fungi respectively, were planted in pot in the condition of 26 - 28 °C, 95% relative humidity, 12-hour photophase and 12-hour scotophase after 16 hours illumination. The seedlings were spraying camptothecin in concentrations of with three replications. In the field, the cucumber seedlings inoculated with *P. cubensis* were spraying with 5, 10, 20, 40 mg·L<sup>-1</sup> camptothecin, 600 mg·L<sup>-1</sup> flumorph-mancozeb and water (the control) by three replications. The results showed that the product exhibited strong antifungal activity on the three plant pathogens, the  $\rho_{1c50}$  and  $\rho_{1c90}$  values were 41.964 mg·L<sup>-1</sup>, 40.495 mg·L<sup>-1</sup>, 27.489 mg·L<sup>-1</sup> and 756.776 mg·L<sup>-1</sup>, 247.026 mg·L<sup>-1</sup>, 341.818 mg·L<sup>-1</sup> respectively. Field test of camptothecin against *P. cubensis* also showed that camptothecin had high inhibition effects on the pathogen, and the  $\rho_{1c50}$  and  $\rho_{1c90}$  values were 11.221 mg·L<sup>-1</sup> and 69.128 mg·L<sup>-1</sup> respectively. [Ch, 2 tab. 13 ref.]

**Key words:** plant protection; camptothecin; *Rhizoctonia solani*; *Sphaerotheca fuliginea*; *Pseudoperonospora cubensis*; natural fungicides

利用植物资源对有害生物进行防治及新植物源农药开发研究已成为当前农药学研究的热点。植物源农药具有高效、无公害、能与环境相容、作用机制独特及开发费用低廉等特点, 具有明显的生态效益、经济效益和社会效益。植物源农药占整个农药领域专利申请量的很少, 大力开发植物源农药是当务之急。中国正式登记注册的植物农药品种达 16 种之多, 生产厂家达 46 家, 品种包括烟碱、苦参碱、鱼藤酮、茵蒿素、藜芦碱、苦皮藤素、川楝素、印楝素、毒藜碱、茶皂素和乙蒜素等<sup>[1-7]</sup>。喜树

收稿日期: 2007-11-13; 修回日期: 2008-05-24

基金项目: 浙江省重大科技攻关项目(2004C22029; 2005C12018)

作者简介: 张立钦, 教授, 博士, 从事生物农药和森林病理等研究。E-mail: zhangliqin@zjfc.edu.cn

碱是喜树 *Camptotheca acuminata* 叶、根皮和种子中的生物碱。喜树碱种类较多, 包括喜树碱(camp-tothecin), 喜树次碱即印度鸭脚树碱(venoterpine), 3, 4-三甲基并没食子酸(3, 4-tri-o-methyllellagic acid), 谷甾醇, 羟基喜树碱(hydroxycamptothecine)和甲基喜树碱(methoxycamptothecine)。除此之外, 喜树果实中还含羟基喜树碱, 去氧喜树碱(deoxycamptothecine), 喜树次碱, 白桦脂酸(betulinic acid)和喜果苷即长春苷内酰胺(vincoside-lactam)。国内外对喜树碱的药理活性、临床应用及光照对喜树碱合成影响等方面进行了大量研究<sup>[8]</sup>, 发现喜树碱是一种抗肿瘤的特效药<sup>[9]</sup>。它在体外对 HeLa 细胞和 L1210 细胞及啮齿类动物显示较强的抗癌活性。喜树碱的作用靶标是拓扑异构酶 I(topo I), 其作用机制是阻断 topo I, 从而阻断 DNA 合成而达到杀死癌细胞的功效<sup>[10]</sup>。临床前研究表明, 喜树碱对各种移植的动物肿瘤及移植于裸鼠身上的胃癌和大肠癌均有显著疗效, 对多种药物有耐性的肿瘤也相当有效<sup>[11]</sup>。当前, 美国、日本、加拿大、中国, 积极投入喜树碱开发, 合成了数百种衍生物进行生化筛选, 不少药物的抗癌机制已经进行了临床使用<sup>[12]</sup>。但至目前为止, 由于用喜树碱为原料制成的多种药剂副作用较大而不能直接应用于人类的抗癌药物, 而是采用其副作用小的同系物作为抗癌药物研究。作者以喜树碱为原药, 进行农用杀菌剂的开发与研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试药剂

纯度大于 95% 的喜树碱原粉, 购自于四川省锦全天然产物有限公司, 溶解于 DMF(N, N-甲基二甲酰胺)中, 并加入少量乳化剂 OP-10, 配置成  $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的喜树碱乳油。

### 1.2 供试病原菌

水稻纹枯病 *Rhizoctonia solani*, 黄瓜白粉病 *Sphaerotheca fuliginea*, 黄瓜霜霉病 *Pseudoperonospora cubensis*, 均由浙江省化工研究院提供。

### 1.3 生物活性测定方法

1.3.1 室内测定 测定方法为温室盆栽法, 调控温度为  $26 \sim 28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , 箱内相对湿度为 95%, 接种后 16 h 内保证黑暗条件, 16 h 后光照: 黑暗=12:12; 对化合物进行扩大筛选靶标以及供试作物的试验, 化合物筛选浓度, 设 5 个剂量梯度, 每处理设 3 个重复。采用 ASP-1098 自动喷雾装置定量喷雾。喷雾机设置状态: 喷雾压力为  $40 \times 6.895 \text{ kPa}$ , 喷头孔径 0.5 mm。每天进行一次观察, 对作物长势有无异常等进行记录。根据发病等级计算防效, 并求出化合物的毒力回归方程、半数致死质量浓度、90% 致死质量浓度等, 分析统计结果, 评价其化合物的活性大小<sup>[13]</sup>。

1.3.2 田间试验 ①供试药剂。供试药剂为  $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  喜树碱乳油, 以  $600 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  氟吗-锰锌可湿性粉剂(辽宁省沈阳化工研究院试验厂生产, 市售)为对照药剂并加清水对照。②试验作物及防治对象。试验作物黄瓜品种为本地白皮黄瓜 *Cucumis sativus*; 防治对象为黄瓜霜霉病。③田间设计。试验在浙江省兰溪市兰江街道办事处徐尚源村徐洪昌户的春黄瓜大棚内进行。试验共设 6 个处理, 分别为:  $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的喜树碱乳油 5, 10, 20,  $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $600 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  氟吗-锰锌可湿性粉剂  $600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  及清水空白对照, 重复 3 次。小区面积为  $6 \text{ m}^2$ , 区组随机排列, 四周不设保护行, 施药时围膜保护。④试验地概况。试验前作为冬大棚芹菜 *Apium graveolens*, 土质为砂壤土, pH 7.4, 有机质  $30.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 肥力较高, 整棚面积约为  $200 \text{ m}^2$ , 2007 年 1 月 14 日播种, 1 月 14 - 15 日定植, 黄瓜苗长势较平衡, 试验前 30 d 未用任何杀菌剂。⑤施药时间及方法。试验于 2007 年 5 月 4 日第 1 次用药, 此时黄瓜生育期为旺果期, 黄瓜霜霉病极零星发生, 由于当时发病极少, 故施药前摘除少数几张病叶。由于气候晴朗不利于病害发生, 第 2 次施药时间间隔延长至 8 d, 即在 5 月 12 日。施药采用工农-16 型手动喷雾器细喷雾, 第 1 次和第 2 次施药量均为  $0.15 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2}$ 。⑥调查内容和方法。试验于第 2 次药后 8 d(由于气候晴朗不利于病害发生, 原设计一次药后 8 d 调查因无病取消)每小区随机取样 2 点, 每点调查相连 4 株, 共 8 株, 分级调查每株全部叶片, 计算病情指数和防效, 并进行邓肯氏新复极差(DMRT)显著性分析, 分级标准和计算方法按照 GB / T 17980.26 - 2000 农药田间药效试验准则(一)规定执行。试验还于各调查日目测施药对黄瓜生长的影响情况, 对安全性进行了考察。

## 2 结果与分析

温室盆栽的结果见表 1。2.0 g·L<sup>-1</sup> 喜树碱乳油对 3 种病害均表现出一定的活性。活性大小为：黄瓜霜霉病 > 黄瓜白粉病 > 水稻纹枯病，其半数致死质量浓度和 90%致死质量浓度为 27 ~ 42 mg·L<sup>-1</sup> 和 247 ~ 757 mg·L<sup>-1</sup>。

表 1 2.0 g·L<sup>-1</sup> 喜树碱乳油对 3 种病害的活性

Table 1 Activity of 2.0 g·L<sup>-1</sup> camptothecin against three plant pathogens

病 害	回归方程	相关系数	显著水平	半数致死质量浓度/(mg·L <sup>-1</sup> )	90%致死质量浓度/(mg·L <sup>-1</sup> )
水稻纹枯病(盆栽)	$P = 0.138 \ln C - 0.0168$	0.993	0.007	41.964	756.776
黄瓜白粉病(盆栽)	$P = 0.221 \ln C - 0.3187$	0.963	0.037	40.495	247.026
黄瓜霜霉病(盆栽)	$P = 0.158 \ln C - 0.0259$	0.999	0.001	27.489	341.818
黄瓜霜霉病(田间)	$P = 0.220 \ln C + 3.0075$	0.988	0.006	11.221	69.128

说明：P 和 C 分别代表百分抑制率和原药浓度的自然对数。

田间效果从表 2 可以看出，2.0 g·L<sup>-1</sup> 喜树碱乳油 5, 10, 20, 40 mg·L<sup>-1</sup>，600 g·kg<sup>-1</sup> 氟吗-锰锌可湿性粉剂 600 mg·L<sup>-1</sup>，2 次药后 8 d 对黄瓜霜霉病的平均防效分别为 32.8%，45.2%，65.4%，76.9%，对照药剂 600 g·kg<sup>-1</sup> 氟吗-锰锌可湿性粉剂 600 mg·L<sup>-1</sup> 防效为 93.3%，经 (DMRT) 显著性分析，600 g·kg<sup>-1</sup> 氟吗-锰锌可湿性粉剂 600 mg·L<sup>-1</sup>，2.0 g·L<sup>-1</sup> 喜树碱乳油 5, 10, 20, 40 mg·L<sup>-1</sup> 防效从高到低前者均显著优于后者。2.0 g·L<sup>-1</sup> 的喜树碱乳油 20 和 40 mg·L<sup>-1</sup> 对黄瓜霜霉病的平均防效虽不及当前市场上使用的效果很好的已登记杀菌剂 600 g·kg<sup>-1</sup> 氟吗-锰锌可湿性粉剂 600 mg·L<sup>-1</sup> 处理，但防效亦接近和达到 70%，在生产上具有一定的推广应用价值。从表 1 可见，对黄瓜霜霉病的田间药效的回归方程可以计算出田间效果的半数致死质量浓度和 90%致死质量浓度分别为 11.221 和 69.128 mg·L<sup>-1</sup>，因此，建议使用质量浓度为 30 ~ 70 mg·L<sup>-1</sup> 为佳。

表 2 2.0 g·L<sup>-1</sup> 喜树碱乳油对黄瓜霜霉病的田间药效试验

Table 2 Activity of 2.0 g·L<sup>-1</sup> camptothecin against *Pseudoperonospora cubensis* in field test

试验药物	处理质量浓度/(mg·L <sup>-1</sup> )	调查总叶/片	病指	防效/%
2.0 g·L <sup>-1</sup> 喜树碱乳油	40	205 (165 ~ 245)	1.63 (0.69 ~ 2.57)	76.9 (68.9 ~ 85.0)
	20	199 (183 ~ 214)	2.53 (0.88 ~ 4.19)	65.5 (57.1 ~ 73.8)
	10	205 (182 ~ 228)	4.00 (1.48 ~ 6.52)	45.2 (32.8 ~ 57.6)
	5	204 (187 ~ 221)	4.80 (2.52 ~ 7.08)	32.7 (11.0 ~ 54.5)
600 g·kg <sup>-1</sup> 氟吗-锰锌可湿性粉剂	600	210 (195 ~ 226)	0.53 (-0.23 ~ 1.29)	93.3 (85.6 ~ 99.9)
清水对照	0	199 (149 ~ 249)	7.37 (1.72 ~ 13.01)	0.0 (0.0 ~ 0.0)

说明：括号中数值为变幅，置信区间 95%。

## 3 讨论

在试验的过程中，发现药物对靶标作物水稻 *Oryza sativa* 比较安全，但高质量浓度下，对黄瓜果实均有一定的影响，表现为白皮黄瓜果实表皮发黄，无光泽(仅限于表皮，不深入内部)，虽对产量无影响，但影响产品外观和销售。这可能是由于溶剂 DMF(N, N 甲基二甲酰胺)引起的作物药害，由于喜树碱难于溶解于各种溶剂，在制造乳油制剂的过程中不得不大量使用溶剂 DMF，虽然 DMF 对作物毒性很低，但高质量浓度使用的情况下难免对比较敏感的黄瓜造成轻微药害，因此，为了避免这个问题，应该制造含量高于 2.0 g·L<sup>-1</sup> 的乳油制剂或可湿性粉剂，大大减少溶剂的使用浓度。

对  $2.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  喜树碱乳油按照 GB 15670 - 1995 农药登记毒理学试验方法进行了急性经口毒性、急性经皮毒性、眼刺激、皮肤刺激和皮肤致敏等卫生毒理试验。结果表明： $2.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  喜树碱乳油属于低毒农药，接近于国际无毒农药的标准，它对哺乳动物和人是安全的。

本试验对 3 种病害进行了室内盆栽活体试验和黄瓜霜霉病的田间药效试验，另 2 种病害，黄瓜白粉病和水稻纹枯病的田间效果以及杀菌谱的扩大试验还有待进一步研究，以期尽快实现新农药的登记及产业化。

#### 参考文献：

- [1] 沈嘉, 程新胜. 植物抗虫物质烟碱的研究进展[J]. 热带亚热带植物学报, 2007, **15** (5): 459 - 464.
- [2] 韦平英, 梁英, 侯美珍. 苦参生物碱对几种植物病原菌的抑制作用研究初报[J]. 广西植保, 2003, **16** (2): 1 - 2.
- [3] 故宝根, 姜锋. 我国生物农药的现状和问题: 微生物农药及产业化[M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [4] 杨征敏, 吴文君, 王明安, 等. 苦皮藤假种皮中的杀菌活性成分研究[J]. 农药学学报, 2001, **3** (2): 93 - 96.
- [5] BERME P. Pesticidal compounds from higher plants[J]. *Pestic Sci*, 1993, **39**: 95 - 102.
- [6] 荣晓冬, 徐汉虹, 赵善欢. 植物性杀虫剂印楝的研究进展[J]. 农药学学报, 2000, **2** (2): 9 - 14.
- [7] 赵善欢. 植物化学保护[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1999.
- [8] 顾青, 朱睦元. 光照对喜树愈合组织生理及喜树碱合成的影响[J]. 浙江林学院学报, 2006, **23** (3): 280 - 284.
- [9] 任中海, 全运科, 张成辉, 等. 羟基喜树碱抗癌谱的实验研究[J]. 肿瘤防治杂志, 2002, **9** (1): 27 - 29.
- [10] HSIANG Y H, HERTZBERG R, HECHT S, *et al.* Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase [J]. *Biol Chem*, 1985, **260**: 14 873 - 14 878.
- [11] LERCHEN H G, BAUMGARTEN J. Design and optimization of 20-O-linked camptothecin glycoconjugates as anticancer agents[J]. *J Med Chem*, 2001, **44** (24): 4 186 - 4 195.
- [12] LI S Y. Activity of camptothecin, trifolin, and hyperoside isolated from *Camptotheca acuminata*[J]. *J Agric Food Chem*, 2005, **53** (1): 32 - 37.
- [13] 陈年春. 农药生物测定技术[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1991: 130 - 207.