

## 杨梅叶提取物对 6 种常见植物病原菌的抑制活性

刘洪波<sup>1</sup>, 史冬辉<sup>1</sup>, 陈安良<sup>1</sup>, 应蒙蒙<sup>2</sup>, 张立钦<sup>1</sup>

(1. 浙江林学院 林业与生物技术学院, 浙江 临安 311300; 2. 南京林业大学 森林资源与环境学院, 江苏 南京 210037)

**摘要:** 采用生长速率法对杨梅 *Myrica rubra* 叶丙酮提取物和杨梅素进行了系统的抑菌作用测定。杨梅叶丙酮提取物对水稻纹枯病菌 *Rhizoctonia solani*, 油菜菌核病菌 *Sclerotinia sclerotiorum*, 番茄灰霉病菌 *Botrytis cinerea*, 小麦赤霉病菌 *Fusarium graminearum*, 苹果腐烂病菌 *Valsa mali*, 棉花枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* f. *vasinfectum* 等 6 种植物病原菌均有较强的抑制活性, 其抑制中质量浓度 EC<sub>50</sub> 分别为: 23.08, 19.85, 25.86, 22.07, 23.18 和 22.86 g·L<sup>-1</sup>; 杨梅素对以上 6 种菌的 EC<sub>50</sub> 分别是: 0.32, 0.33, 1.09, 0.69, 0.34 和 2.09 g·L<sup>-1</sup>, 其中对水稻纹枯病菌、油菜菌核病菌和苹果腐烂病菌的抑制活性较高。采用番茄果实组织法, 测得杨梅叶丙酮提取物和杨梅素水乳剂对番茄灰霉病的治疗作用和保护作用。测定结果表明, 杨梅叶丙酮提取物 10 倍稀释液 (40 g·L<sup>-1</sup>) 有较强的效果。表 3 参 11

**关键词:** 植物保护学; 杨梅; 粗提取物; 杨梅素; 抑菌活性

中图分类号: S482.2+92; Q946 文献标志码: A 文章编号: 1000-5692(2009)01-0095-05

## Antifungal activity of extracts from leaves of *Myrica rubra*

LIU Hong-bo<sup>1</sup>, SHI Dong-hui<sup>1</sup>, CHEN An-liang<sup>1</sup>, YING Meng-meng<sup>2</sup>, ZHANG Li-qin<sup>1</sup>

(1. School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 2. College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China)

**Abstract:** The objective is to test the antifungal activity of extracts from *Myrica rubra* leaves and myricetin. Based on a preliminary test for inhibition of acetone extracts from leaves of *Myrica rubra*, the fungi *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium graminearum*, *Valsa mali* and *Fusarium oxysporum* f. *vasinfectum* were selected and their mycelium growth rate were tested in five concentrations (among 5, 10, 20, 30, 40, 50, and 60 g·L<sup>-1</sup>). Antifungal activity was also tested with pure myricetin acetone solution in five concentrations (among 0.30, 0.40, 0.50, 0.60, 0.70, and 0.80 g·L<sup>-1</sup>). Results showed that when restraining effect were 50%, concentrations of extracts from leaves of *M. rubra* were (in g·L<sup>-1</sup>) *R. solani*(23.08), *S. sclerotiorum*(19.85), *B. cinerea* (25.86), *F. graminearum*(22.07), *V. mali*(23.18), and *F. oxysporum* f. *vasinfectum*(22.86). Meanwhile, when inhibition was 50%, concentrations with pure myricetin acetone solution for the same fungi were 0.32, 0.33, 1.09, 0.69, 0.34 and 2.09 g·L<sup>-1</sup> respectively. A stronger effect of 10 times the diluent from leaves of *M. rubra* showed a therapeutic action 42.3% and a protective function 45.6% on tomato. [Ch, 3 tab. 11 ref.]

**Key words:** plant protection; *Myrica rubra*; extract; myricetin; antifungal activity

从植物中寻找抑菌活性物质, 是开发、研制新型杀菌剂的热点之一<sup>[1-3]</sup>。杨梅 *Myrica rubra* 叶提取物对多种细菌、真菌和病毒有很好的抑制作用<sup>[4-5]</sup>。杨梅叶中含有杨梅素、槲皮素等多种黄酮类化合物<sup>[6]</sup>。杨梅素(3, 5, 7, 3', 4', 5', -六羟基黄酮, myricetin)又称杨梅树皮素, 在民间, 人们用含

收稿日期: 2008-02-27; 修回日期: 2008-06-16

基金项目: 浙江省重大科技攻关项目(2005C12022)

作者简介: 刘洪波, 从事生物农药研究。E-mail: lhb@zjfc.edu.cn; 通信作者: 张立钦, 教授, 博士, 从事生物农药和森林病理学研究。E-mail: zhangliqin@zjfc.edu.cn.

有杨梅素和杨梅素苷的杨梅树皮作抗菌消炎药<sup>[7]</sup>,现在已有保健药品将杨梅素作为添加剂来预防治疗关节炎和各种炎症,并有望进一步将杨梅素开发为特殊人群的消炎用药,从而减轻抗生素对人体的毒副作用<sup>[8]</sup>。对二氢杨梅素(3, 5, 7, 3', 4', 5', -六羟基黄酮-2, 3-双氢黄酮醇, dihydromyricetin, DMY)的广泛研究发现,它对食品、医学上的多种细菌和真菌具有明显抑制作用<sup>[9-11]</sup>。作者对杨梅叶提取物和杨梅素对植物病原菌的抑制活性进行了研究,以期为杨梅植物资源的开发奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试样品

杨梅叶于2006年10月采于浙江林学院校园内,经风干,45℃烘干粉碎,过40目筛(孔径0.37 mm)后以冷浸法丙酮提取3次,提取时间分别为72, 48, 24 h,合并滤液,浓缩至质量浓度为 $2.0 \times 10^3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (干样),移装于250 mL棕色广口瓶中,于冰箱中(0~4℃)保存备用。杨梅素购于杭州禾田生物技术有限公司,纯度98%(HPLC级)。番茄 *Lycopersicon esculentum* 市购。

### 1.2 实验仪器与试剂

仪器:BUCHI R-200 旋转蒸发仪,SHB-III 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司),PRX-350C 智能人工气候箱(宁波海曙赛福实验仪器厂),SW-CJ-1F 型单人双面净化工作台(苏州净化设备有限公司)。试剂:丙酮(分析纯,杭州大方化学试剂厂),三唑酮(20%乳油,江苏剑牌农药化工有限公司),环己酮(宜兴市第二化学试剂厂),OP-10 乳化剂(益民),500号乳化剂(益民),602号乳化剂(益民)。

### 1.3 供试菌种

水稻纹枯病菌 *Rhizoctonia solani*, 油菜菌核病菌 *Sclerotinia sclerotiorum*, 番茄灰霉病菌 *Botrytis cinerea*, 小麦赤霉病菌 *Fusarium graminearum*, 苹果腐烂病菌 *Valsa mali*, 棉花枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* f. *vasinfectum*, 均由浙江林学院森林保护实验室提供。

### 1.4 番茄组织法测定药剂配制

1.4.1 杨梅叶丙酮提取物水乳剂配制 2 mL  $2.0 \times 10^3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  杨梅叶丙酮提取液 + 5.0 g 丙酮 + 0.8 g 环己酮 + 1.0 g OP-10 乳化剂 + 0.25 g 500号乳化剂(共10 mL)。将它们稀释10倍(质量浓度为 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 干样),20倍(质量浓度为 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 干样)供试。对照为把以上配制方法中的杨梅叶丙酮提取物换成等量水。

1.4.2 杨梅素水乳剂配制 0.15 g 杨梅素 + 5.0 g 丙酮 + 1.0 g 环己酮 + 0.9 g 602号乳化剂,再稀释20倍(质量浓度为 $1.04 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ),40倍(杨梅素质量浓度为 $0.52 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )供试。对照为把以上配制方法中的杨梅素换成等量水。

1.4.3 三唑酮溶液配制 取100 μL 三唑酮20%乳油,用水定容至200 mL,使溶液质量浓度为 $0.10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。对照为清水。

### 1.5 试验方法

1.5.1 杨梅叶丙酮提取物离体试验方法 杨梅叶粗提物对供试菌抑制作用的测定采用生长速率法。配制杨梅叶干样质量浓度为5, 10, 20, 30, 40, 50, 60  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基。对对照培养基为同等体积的丙酮和PDA培养基混合。在预实验的基础上,选择合适的5个质量浓度梯度,每个设3次重复,接入生长旺盛的直径为5 mm病原菌菌饼,在25℃条件下培养,定期观察并测定菌落直径,每个菌落十字交叉测2个直径,以其平均数代表菌落大小。用下列公式计算菌丝生长抑制率:

$$\text{菌落直径(cm)} = \text{测量菌落直径平均值} - 0.5;$$

$$\text{抑制率(\%)} = \frac{(\text{对照菌落直径} - \text{处理菌落直径}) \times 100}{\text{对照菌落直径}}。$$

1.5.2 杨梅素离体试验方法 实验方法同1.5.1。配制PDA培养基,杨梅素质量浓度为0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。对对照也是丙酮对照。在预实验的基础上,选择合适的5个质量浓度供试,每个设3次重复。

1.5.3 番茄组织法 治疗作用测定方法: 把番茄用水清洗干净, 晾干, 用针在 5 mm 直径范围内刺 10 次, 接入生长旺盛的同一圆周上直径为 5 mm 的番茄灰霉菌饼, 正面朝下, 每个番茄接 2 个菌饼, 每组 6 个重复。接好菌后放入温度为 20 ℃, 湿度为 90% 的培养箱中, 培养 24 h 后, 在番茄表面涂上配制好的药剂, 放入培养箱继续培养, 4 ~ 5 d 后测量病斑直径, 得出治疗效果, 并和 0.10 g·L<sup>-1</sup> 三唑酮效果比较。保护作用测定方法: 把番茄用水清洗干净, 晾干, 在番茄表面涂上配制好的药剂, 过 24 h 后在番茄上用针在 5 mm 直径范围内刺 10 下, 接入生长旺盛的同一圆周上直径为 5 mm 的番茄灰霉菌饼, 正面朝下, 每个番茄接 2 个菌饼, 每组 6 个重复, 接好菌后放入温度为 20 ℃, 湿度为 90% 的培养箱中培养, 4 ~ 5 d 后测量病斑直径, 得出保护效果, 并和 0.10 g·L<sup>-1</sup> 三唑酮效果比较。

## 1.6 数据处理方法

由于不同的菌种生长速率不同, 取得的抑制率值其真菌培养的天数也不同, 水稻纹枯病菌的抑制率值为培养 3 d 的值, 小麦赤霉和苹果腐烂为培养 4 d, 油菜菌核、番茄灰霉和棉花枯萎为培养 7 d。用 Microsoft Office-Excel 2003 软件将 5 个质量浓度梯度下的抑制率换算成几率值( $y$ ), 药剂浓度换算成对数值( $x$ ), 用 SPSS 11.5 软件进行分析, 得出毒力回归方程  $y = b_1x + b_0$ , 计算出对病原菌的抑制中质量浓度 EC<sub>50</sub>。1.5.3 节中治疗和保护效果计算方法同 1.5.1 节中的抑制率计算方法。测量出番茄上的病斑直径, 得出平均值, 根据公式求出治疗和保护效果。

## 2 结果与分析

### 2.1 杨梅叶丙酮提取物对 6 种病原菌毒力测定结果

从表 1 可以看出, 杨梅叶丙酮提取物对油菜菌核病菌的毒力作用最强, 对番茄灰霉病菌的毒力作用最弱, 差值为 6.01 g·L<sup>-1</sup>。EC<sub>50</sub> 从小到大排列分别为: 油菜菌核病菌 19.85 g·L<sup>-1</sup> < 小麦赤霉病菌 22.07 g·L<sup>-1</sup> < 棉花枯萎病菌 22.86 g·L<sup>-1</sup> < 水稻纹枯病菌 23.08 g·L<sup>-1</sup> < 苹果腐烂病菌 23.18 g·L<sup>-1</sup> < 番茄灰霉病菌 25.86 g·L<sup>-1</sup>。

表 1 杨梅叶丙酮提取物对 6 种病原菌毒力测定结果

Table 1 Toxicity of the extracts of *Myrica rubra* to 6 phytopathogenic fungi

病原菌	毒力回归方程	相关系数	EC <sub>50</sub> /(g·L <sup>-1</sup> )
水稻纹枯病菌 <i>Rhizoctonia solani</i>	$y = 1.6437x - 2.1719$	0.995**	23.08
油菜菌核病菌 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	$y = 0.8780x + 1.2266$	0.999**	19.85
番茄灰霉病菌 <i>Botrytis cinerea</i>	$y = 0.8035x + 1.4545$	0.996**	25.86
小麦赤霉病菌 <i>Fusarium graminearum</i>	$y = 1.3588x - 0.9023$	0.994**	22.07
苹果腐烂病菌 <i>Valsa mali</i>	$y = 1.9308x - 3.4284$	0.995**	23.18
棉花枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i> f. <i>vasinfectum</i>	$y = 4.2658x - 13.7480$	0.983**	22.86

说明:\*\*表示  $P < 0.01$ 。

表 2 杨梅素对 6 种病原菌毒力测定结果

Table 2 Toxicity of myricetin acetone solution to 6 phytopathogenic fungi

病原菌	毒力回归方程	相关系数	EC <sub>50</sub> /(g·L <sup>-1</sup> )
水稻纹枯病菌 <i>Rhizoctonia solani</i>	$y = 2.6439x - 1.6084$	0.928**	0.32
油菜菌核病菌 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	$y = 4.0722x - 5.2391$	0.978**	0.33
番茄灰霉病菌 <i>Botrytis cinerea</i>	$y = 1.2176x + 1.3030$	0.989**	1.09
小麦赤霉病菌 <i>Fusarium graminearum</i>	$y = 3.1802x - 4.0288$	0.998**	0.69
苹果腐烂病菌 <i>Valsa mali</i>	$y = 2.8829x - 2.3082$	0.940**	0.34
棉花枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i> f. <i>vasinfectum</i>	$y = 0.8433x + 2.2003$	0.998**	2.09

说明:\*\*表示  $P < 0.01$ 。

## 2.2 杨梅素对6种病原菌毒力测定结果

从表2可以看出, 杨梅素对水稻纹枯病菌的毒力作用最强, 对棉花枯萎病菌的毒力作用最弱, 差值为  $1.77 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。EC<sub>50</sub> 从小到大排列分别为: 水稻纹枯病菌  $0.32 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  < 油菜菌核病菌  $0.33 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  < 苹果腐烂病菌  $0.34 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  < 小麦赤霉病菌  $0.69 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  < 番茄灰霉病菌  $1.09 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  < 棉花枯萎病菌  $2.09 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

## 2.3 杨梅叶丙酮提取物和杨梅素水乳剂对番茄灰霉病的治疗及保护作用

从表3可以看出杨梅叶丙酮提取物和杨梅素的水乳剂对番茄灰霉病的保护作用稍强于治疗作用。治疗作用和保护作用中, 效果顺序都为:  $0.10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  三唑酮 > 杨梅叶丙酮提取物 10 倍稀释液 ( $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) > 杨梅叶丙酮提取物 20 倍稀释液 ( $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) > 杨梅素 20 倍稀释液 ( $1.04 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) > 杨梅素 40 倍稀释液 ( $0.52 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ )。

表3 杨梅叶丙酮提取物和杨梅素的水乳剂对番茄灰霉病的治疗及保护效果

Table 3 Therapeutic and protective effect of extracts of *Myrica rubra* and myricetin to *Botrytis cinerea*

作用	杨梅叶丙酮提取物抑制率/%		杨梅素抑制率/%		三唑酮抑制率/%
	$40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$	$20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$	$1.04 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$	$0.52 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$	$0.10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
治疗	42.3 b	30.9 c	18.5 d	12.3 e	55.7 a
保护	45.6 b	32.5 c	20.0 d	15.3 e	52.3 a

说明: a~e 表示同行数据 Tucky 检验 0.05 水平差异, 字母相同表示差异不显著, 字母不同表示差异显著。

## 3 讨论

张莉静<sup>[7]</sup>通过实验得出杨梅叶中的杨梅素质量浓度约为  $0.60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 通过换算,  $19.85 \sim 25.86 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  的杨梅叶丙酮提取物仅含有  $11.91 \sim 15.51 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的杨梅素, 但抑菌作用明显好于杨梅素。杨梅叶丙酮提取物 10 倍稀释液 ( $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和 20 倍稀释液 ( $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 杨梅素质量浓度也仅为 24 和  $12 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 但杨梅叶丙酮提取物对番茄治疗和保护效果明显高于杨梅素。由此可以推断: 在抑菌过程中, 杨梅叶粗提取物中还有其他物质和杨梅素共同作用, 才形成了较强的抑菌效果。在接下来的实验中将杨梅叶粗提取物中杨梅素含量进行测定, 对其他抑菌成分作进一步的研究, 以期发现新的活性较高的化合物; 扩大供试菌种范围, 确定其杀菌谱, 为杨梅叶提取物杀菌剂的开发奠定基础。

## 参考文献:

- [1] RISTIC M, SOKOVIC M, GRUBISIC D, *et al.* Chemical analysis and antifungal activity of the essential oil of *Achillea atrata* L.[J]. *J Essent Oil Res*, 2004, **16** (1): 75 - 78.
- [2] GATA-GONCALVES L, NOGUEIRA J M F, MATOS O, *et al.* Photoactive extracts from *Thevetia peruviana* with antifungal properties against *Cladosporium cucumerinum*[J]. *J Photochem Photobiol B Biol*, 2003, **70** (1): 51 - 54.
- [3] 殷舒, 毛胜凤, 杨琼霞, 等. 山核桃叶片提取物的抑菌作用[J]. 浙江林学院学报, 2007, **24** (5): 604 - 607.  
YIN Shu, MAO Shengfeng, YANG Qionxia, *et al.* Bacteriostasis and fungistasis with extracts from *Carya cathayensis* leaves[J]. *J Zhejiang For Coll*, 2007, **24** (5): 604 - 607.
- [4] 胡静丽. 杨梅叶提取物抑菌作用的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2002.  
HU Jingli. *Study on Antimicrobial Activity of Extracts From Leaves of Myrica rubra*[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2002.
- [5] 沈建国, 谢荔岩, 翟梅枝, 等. 杨梅叶提取物抗烟草花叶病毒活性及其化学成分初步研究[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2004, **33** (4): 441 - 443.  
SHEN Jianguo, XIE Liyan, ZAI Meizhi, *et al.* Antiviral activity and chemical compositions of extracts from *Myrica rubra* [J]. *J Fujian Agric For Univ Nat Sci Ed*, 2004, **33** (4): 441 - 443.
- [6] 邹耀洪, 李桂荣. 杨梅叶黄酮类化合物研究[J]. 常熟高专学报: 自然科学版, 1998, **7** (1): 36 - 39.  
ZOU Yaohong, LI Guirong. Study on flavonoids compound from leaves of *Myrica rubra* [J]. *J Changshu Coll Nat Sci Ed*, 1998, **7** (1): 36 - 39.

- [7] 张莉静. 杨梅树不同部位及不同生长年限茎皮中杨梅素含量比较研究[J]. 现代中医药, 2006, **26** (5): 66 - 67.  
ZHANG Lijing. Comparative study on myricetin content at different sites and under different old stands of *Myrica rubra*[J]. *Mod Tradit Chin Med*, 2006, **26** (5): 66 - 67.
- [8] 唐霖, 张莉静, 王明谦. 杨梅中活性成分杨梅素的研究进展[J]. 中成药, 2006, **28** (1): 121 - 122.  
TANG Lin, ZHANG Lijing, WANG Mingqian. Advance on myricetin in *Myrica rubra* [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2006, **28** (1): 121 - 122.
- [9] 董倩倩, 陈立峰. 二氢杨梅素药理研究进展[J]. 中南药学, 2005, **3** (5): 295 - 298.  
DONG Qianqian, CHEN Lifeng. Advance on pharmacological research of dihydromyricetin [J]. *Cent South Pharm*, 2005, **3** (5): 295 - 298.
- [10] 杨书珍, 张友胜, 宁正祥, 等. 二氢杨梅素对几种食品常见菌的抑制效果[J]. 天然产物研究与开发, 2003, **15** (1): 40 - 42.  
YANG Shuzhen, ZHANG Yousheng, NING Zhengxiang, *et al.* Inhibition of dihydromyricetin on several kinds of microorganism[J]. *Nat Prod Res Dev*, 2003, **15** (1): 40 - 42.
- [11] 孙志良, 刘自逵, 杨伟丽, 等. 二氢杨梅树皮素的抑菌作用研究[J]. 特产研究, 2003 (3): 20 - 23.  
SUN Zhiliang, LIU Zikui, YANG Weili, *et al.* Studies on antibacterial activity of dihydromyricetin [J]. *Spec Wild Econ Anim Plant Res*, 2003 (3): 20 - 23.



## “森林生态系统碳汇计量方法与技术”高级研讨班

2008年10月28日,由浙江省人事厅和浙江省科学技术厅社会发展处优先主题项目“毛竹林吸收温室气体二氧化碳关键技术研究与应用示范”共同资助的“森林生态系统碳汇计量方法与技术”高级研讨班在浙江林学院举办。国家林业局造林司副司长李怒云,浙江省人事厅副厅长傅玮,浙江林学院常务副校长周国模等出席了本次研讨班。此外,来自中国林科院亚热带林业研究所、浙江省林科院、浙江省农科院、杭州电子科技大学、浙江林学院以及浙江省各县(市)林业局的近60名代表也参加了研讨班。

研讨班上,李怒云副司长、周国模教授、姜培坤教授和施拥军副教授分别作了“林业碳汇与国际碳贸易”“毛竹林生态系统固持二氧化碳的能力及其在未来碳汇贸易中的潜力”“森林土壤碳汇与计量”和“林业碳汇项目方案编制与碳汇计量监测方法”等专题报告,并与参会代表进行了热烈的讨论。

研讨班的顺利举办,进一步提高了林业科技工作者对森林固碳重要性的认识,对森林碳汇的计量方法与技术有了更深入的理解。

李永夫