

山核桃外果皮提取物抑菌活性的初步研究

苏秀, 马良进, 陈安良, 张立钦

(浙江林学院 林业与生物技术学院, 浙江 临安 311300)

摘要: 采用甲醇溶剂对山核桃 *Carya cathayensis* 外果皮进行提取, 并用提取物对番茄灰霉病菌 *Botrytis cinerea*, 番茄早疫病菌 *Alternaria solani*, 黄瓜枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* f. *cucumerinum*, 黄瓜炭疽病菌 *Colletotrichum lagenarium*, 棉花枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* f. *vasinfectum* 等 15 种病菌进行抑菌试验。结果表明: 在供试质量浓度为干样 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 山核桃外果皮甲醇提取物对黄瓜炭疽病菌、黄瓜菌核病菌、苹果腐烂病菌和辣椒疫病菌等 4 种病菌的抑制率为 100%, 除玉米小斑病菌 *Bipolaris maydis* 外, 对其余的 10 种病菌抑制率都在 69% 以上。对其中 6 种供试病菌菌丝生长的毒力测定试验表明: 山核桃外果皮甲醇提取物对水稻纹枯病菌 *Rhizoctonia solani* 的菌丝生长抑制作用最好(半数效应质量浓度为 $29.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 其次为番茄灰霉病菌(半数效应质量浓度为 $31.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 对玉米大斑病菌 *Exserohilum turcicum* 作用最差(半数效应质量浓度为 $46.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)。利用山核桃外果皮开发植物源杀菌剂值得进一步研究。图 1 表 2 参 10

关键词: 森林保护学; 山核桃; 外果皮提取物; 抑菌作用

中图分类号: S789.5; Q946.8 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-5692(2008)03-0355-04

Antifungal and antibacterial activity of extracts from the husk of *Carya cathayensis*

SU Xiu, MA Liang-jin, CHEN An-liang, ZHANG Li-qin

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

Abstract: The last research showed the husk of *Carya cathayensis* contained compounds which can control fungi and bacteria. The antifungal and antibacterial activity of methanol extract from the husk of *Carya cathayensis* was tested with *Botrytis cinerea*, *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum* f. *cucumerinum*, *Colletotrichum lagenarium*, *Fusarium oxysporum* f. *vasinfectum*, *Pyricularia oryzae*, *Exserohilum turcicum*, *Bipolaris maydis*, *Valsa mali*, *Fusarium gramineum*, *Rhizoctinia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Venturia nashicola* and *Phytophthora capsici* by growth speed rate method. Results showed that the extract from the husk of *Carya cathayensis* in a concentration of $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ had 100% inhibition rates on hyphae growth of *Colletotrichum lagenarium*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Valsa mali*, *Phytophthora capsici*, whereas, except *Bipolaris maydis*, there was greater than 69% inhibition rates on the other 10 fungi. The virulence test for six of the 15 (*Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium gramineum*, *Rhizoctinia solani*, *Pyricularia oryzae*, *Exserohilum turcicum*, *Botrytis cinerea*) tested plant pathogens showed that the antifungal activity of the methanol extract from the husk of *C. cathayensis* was the highest against *Rhizoctinia solani* with a median effective concentration required to induce a 50% effect (C_{E50}) of $29.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; next was against *Botrytis cinerea* (C_{E50} of $31.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), and the lowest was against *Exserohilum turcicum* (C_{E50} of $46.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$). Thus, research and development of botanical fungicides using the husk of *Carya cathayensis* should be studied further. [Ch, 1 fig. 2 tab. 10 ref.]

Key words: forest protection; *Carya cathayensis*; extracts from husk; antifungal activity

收稿日期: 2007-06-30; 修回日期: 2007-12-28

基金项目: 浙江省重大科学技术攻关项目(2004C22029)

作者简介: 苏秀, 助理实验师, 硕士, 从事生物防治研究。E-mail: susan_2046@126.com

胡桃科 Juglandaceae 山核桃属 *Carya* 植物全世界约 18 种 2 亚种, 主要分布于北美东部和亚洲东南部。中国分布有 5 种, 引进栽培 1 种。山核桃 *Carya cathayensis*, 又名小胡桃, 系国家三级保护濒危植物^[1]。山核桃主要分布于浙、皖两省交界的天目山区, 地处 29° ~ 31°N, 118° ~ 120°E, 包括浙江临安、淳安、安吉、建德和安徽宁国、歙县、旌德、绩溪等县(市), 总面积近 4.7 万 hm^2 。我国在山核桃方面已有较深入的研究, 主要包括山核桃的引种及栽培^[2], 山核桃嫁接技术研究^[3], 山核桃生长、发育及成花习性的研究^[4], 以及山核桃丰产问题研究^[5]等方面。近年来, 有人发现, 在山核桃的生产加工过程中作为废弃物的外果皮是一种有毒物质, 可以导致鱼虾大量死亡。已经有人分析了不同生育期山核桃外果皮的药用成分, 得到了山核桃外果皮中各脂肪酸的百分含量^[6]以及山核桃外果皮中钙、铁、锰、镁、钾、锌、铜、砷等 8 种矿物元素的含量^[7]。浙江林学院及其他相关单位对山核桃外果皮的成分进行了普测, 发现其中含有生物碱、酚类化合物、鞣质、皂甙、甾体和萜醌类等可作为植物性农药的化合物成分, 可广泛用于经济作物的病害防治, 是一种很有开发潜力的植物源杀菌剂的原材料。浙江林学院殷舒等^[8]研究发现山核桃叶的乙醇和水提取物对金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 等有一定的抑制效果。目前, 在利用山核桃外果皮研制杀菌剂方面还未见报道, 作者对山核桃外果皮提取物的抑菌活性进行研究, 为合理开发和利用山核桃资源提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 供试植物样品

山核桃外果皮由浙江林学院天则山核桃科技发展有限公司提供, 为 2006 年 9 月初山核桃收获季节采摘的新鲜外果皮。

1.2 供试病原菌

供试病原真菌为番茄灰霉病菌 *Botrytis cinerea*, 番茄早疫病菌 *Alternaria solani*, 黄瓜枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* f. *cucumerinum*, 黄瓜炭疽病菌 *Colletotrichum lagenarium*, 棉花枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* f. *vasinfectum*, 水稻稻瘟病菌 *Pyricularia oryzae*, 玉米大斑病菌 *Exserohilum turcicum*, 玉米小斑病菌 *Bipolaris maydis*, 苹果腐烂病菌 *Valsa mali*, 小麦赤霉病菌 *Fusarium gramineum*, 水稻纹枯病菌 *Rhizoctonia solan*, 油菜菌核病菌 *Sclerotinia sclerotior*, 黄瓜菌核病菌 *Sclerotinia sclerotiorum*, 梨黑星病菌 *Venturia nashicola* 和辣椒疫霉病菌 *Phytophthora capsici*, 均由西北农林科技大学无公害农药研究服务中心提供。

1.3 主要仪器与试剂

主要仪器: EYELA 旋转蒸发仪、Sartorius 电子天平、人工气候箱、超纯水器和 SANYO 超净工作台。主要试剂: 甲醇(分析纯, 连云港嘉一化工有限公司生产)。

1.4 提取方法

将山核桃外果皮在烘箱里烘干(50 °C)、粉碎、过 60 目筛(孔径 0.25 mm), 以冷浸法用甲醇提取 3 次, 提取时间分别为 48, 24, 24 h, 合并滤液, 浓缩并定容至质量浓度 1 000 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (干样), 为山核桃外果皮甲醇提取原液, 于冰箱中(0 ~ 4 °C)冷藏备用^[9]。

1.5 抑菌活性测定

采用生长速率法^[10]测定山核桃外果皮甲醇提取物的抑菌活性。用无菌水将山核桃外果皮甲醇提取原液配制成质量浓度为 10 和 100 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在无菌条件下, 将培养好的供试病原菌用 0.4 cm 的打孔器打出一定数量的菌饼备用。用移液器吸取 1 mL 提取物, 放入 9 cm 培养皿内, 然后趁热倒入 9 mL PDA(马铃薯葡萄糖琼脂)培养基, 制成薄厚均匀的平板。用灭过菌的镊子小心将菌饼放置在上述含药培养基上。菌丝一面向下, 每皿接 1 块, 每种质量浓度 3 皿, 并设不加提取物的为对照, 然后加盖并标记, 置于 23 °C 恒温光照培养箱中培养, 待培养 72 h 后取出培养皿(有些生长较快的病菌如水稻纹枯病菌和油菜菌核病菌培养 48 h), 用游标卡尺量菌落直径(十字交叉量取 2 次, 用其平均数)。按下列公式计算抑制率: 菌落直径(cm) = 2 次直径平均数 - 0.4(菌饼的直径)。抑制率(%) = (对照菌落直径 - 处理菌落直径/对照菌落直径) × 100%。

根据上述实验结果，筛选出抑制效果较明显的 6 种菌，并测定山核桃外果皮甲醇提取物抑制其菌丝生长的毒力。用无菌水将山核桃外果皮甲醇提取原液配制质量浓度为 100.0, 50.0, 25.0, 16.7 和 12.5 g · L⁻¹。其余方法同上。

1.6 数据的处理

用几率值分析法，求出毒力回归方程、半数效应质量浓度和相关系数。

2 结果与分析

2.1 对 15 种供试病原真菌菌丝生长的抑制作用

采用生长速率法测定山核桃外果皮提取物对 15 种病原真菌菌丝生长的抑制作用。结果(表 1)表明，在供试质量浓度为干样 10 g · L⁻¹时，山核桃外果皮甲醇提取物对这 15 种病菌的抑制率都在 30% 以下，对玉米小斑病菌、油菜菌核病菌和辣椒疫病菌等 3 种病菌抑制率为 0，这与试验是用植物粗提物进行测试有关。植物样品粗体物中活性成分甚微，因而在供试质量浓度下未表现较强的抑菌活性。在供试质量浓度为干样 100 g · L⁻¹时，山核桃外果皮甲醇提取物对黄瓜炭疽病菌、黄瓜菌核病菌、苹果腐烂病菌和辣椒疫病菌等 4 种病菌的抑制率为 100%，除玉米小斑病菌外，对其余 10 种病菌的抑制率都在 69% 以上，这说明山核桃外果皮甲醇提取物的抑菌谱较广。

表 1 山核桃外果皮甲醇提取物对 15 种病原真菌的抑制作用

Table 1 Inhibition rates of the methanol extract from the husk of *Carya cathayensis* against the hypha growth of 15 kinds of plant pathogens

供试病原真菌	不同质量浓度提取物抑制率/%		供试病原真菌	不同质量浓度提取物抑制率/%	
	100 g · L ⁻¹	10 g · L ⁻¹		100 g · L ⁻¹	10 g · L ⁻¹
玉米大斑病菌	69.00	15.70	油菜菌核病菌	88.68	0
玉米小斑病菌	23.93	0	棉花枯萎病菌	73.12	15.29
水稻纹枯病菌	69.22	25.48	梨黑星病菌	69.94	17.01
水稻稻瘟病菌	74.30	7.14	苹果腐烂病菌	100	27.89
小麦赤霉病菌	81.36	11.92	番茄灰霉病菌	78.11	22.78
黄瓜炭疽病菌	100	8.98	辣椒疫病菌	100	0
黄瓜枯萎病菌	75.24	20.44	番茄早疫病菌	75.21	11.51
黄瓜菌核病菌	100	3.79			

2.2 对 6 种供试病原真菌菌丝生长的毒力测定

在离体测定中选定了 6 种病原菌为供试菌，测定了山核桃外果皮甲醇提取物抑制其菌丝生长的毒力(表 2, 图 1)。从表 2 中可以看出，山核桃外果皮甲醇提取物对水稻纹枯病菌的菌丝生长抑制作用最好(半数效应质量浓度为 29.8 g · L⁻¹)，其次为番茄灰霉病菌(半数效应质量浓度为 31.1 g · L⁻¹)，对玉米大斑病菌作用最差(半数效应质量浓度为 46.2 g · L⁻¹)。

表 2 山核桃外果皮甲醇提取物对 6 种病菌菌丝生长抑制作用的毒力方程

Table 2 Regression equation of inhibition rates of the methanol extract from the husk of *Carya cathayensis* against the hypha growth of 6 kinds of plant pathogens

供试菌	回归方程	半数效应质量浓度/(g · L ⁻¹)	相关系数	供试菌	回归方程	半数效应质量浓度/(g · L ⁻¹)	相关系数
油菜菌核病菌	y = 9.219 5 + 2.882 6x	34.4	0.999 4	水稻稻瘟病菌	y = 8.119 7 + 2.317 1x	45.0	0.984 7
小麦赤霉病菌	y = 8.426 8 + 2.439 5 x	39.4	0.987 5	玉米大斑病菌	y = 7.565 9 + 1.921 2x	46.2	0.976 6
水稻纹枯病菌	y = 9.219 0 + 2.764 6 x	29.8	0.965 6	番茄灰霉病菌	y = 7.242 6 + 1.485 7x	31.1	0.952 3

说明：x 表示提取物质量浓度的对数值，y 为抑制率。

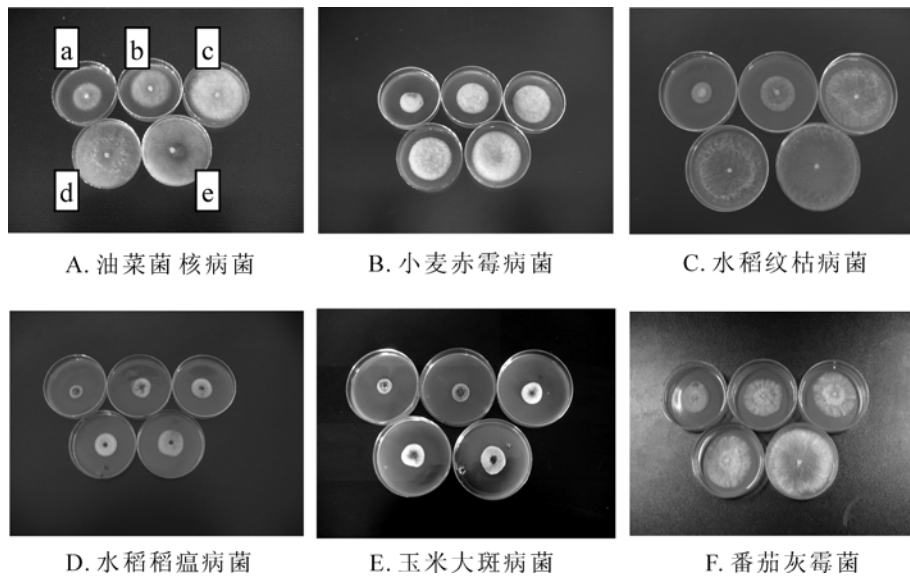


图1 山核桃外果皮甲醇提取物对6种病菌菌丝生长抑制作用

a. 提取原液稀释20倍; b. 提取原液稀释40倍; c. 提取原液稀释60倍; d. 提取原液稀释80倍; e. 不含提取物的对照

Figure 1 Antifungal activity of the methanol extract from the husk of *Carya cathayensis* against the hypha growth of 6 kinds of plant pathogen

a. diluting 20 times; b. diluting 40 times; c. diluting 60 times; d. diluting 80 times; e. ck without extract

3 讨论

山核桃外果皮的甲醇提取物对15种供试病原真菌菌丝生长的抑制作用的试验结果表明:山核桃外果皮有较广泛的抑菌活性。通过对其中6种病原真菌菌丝生长的毒力测定,可以看出:提取物的质量浓度越高,抑菌活性越强;同一质量浓度的提取物对不同病菌的菌丝生长毒力有较大的差异。

植物的化学成分较为复杂,不同溶剂的提取物常有不同的药效。本试验仅采用了甲醇作为提取溶剂,因而不一定能将极性和非极性较强的生物活性物质全部提取出来。本试验并未做多种极性不同溶剂之间的平行提取,如要进一步研究,应尽量采用各种极性不同的溶剂做平行提取。试验中仅选了15种有代表性的病菌,对其他菌的抑菌活性研究就被漏筛了。植物的活性成分与植物的生长情况和分布情况有很大的关系,试验中没有详细描述植物材料的种植收获情况。提取物的质量取决于很多因素,如种植地区、种植条件、成熟度、植物的储藏以及提取方法等。不同提取方法所得的提取物也会有较大的差异,因此,对山核桃外果皮的提取工艺也应该标准化。另外,对于杀菌剂而言,更重要的是看它在活体条件下有没有抑菌活性,试验仅初步进行了离体试验。本研究可以明确山核桃外果皮具有抑菌活性,为进一步研究它们所含有的抑菌生物活性物质奠定了基础。但是,有关山核桃外果皮提取物的杀菌谱、有效成分的分离纯化、对病原菌的作用机制和作用方式及在活体植物上的抑菌活性,均有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] 宋朝枢. 自然保护区工作手册[M]. 北京:中国林业出版社,1988:41-43.
- [2] 何方. 山核桃生态习性与引种栽培问题[J]. 亚林科技,1974(1):28-32.
- [3] 汪祥顺,蔡传山,徐德传,等. 山核桃嫁接技术研究[J]. 林业科技通讯,1997(11):30-32.
- [4] 黎章矩. 山桃花芽分化与开花习性的初步研究[J]. 经济林研究,1984,2(1):28-37.
- [5] 陈国瑞,黄必恒. 影响山核桃产量的主要气象因子分析[J]. 浙江林学院学报,1992,9(2):144-150.
- [6] 蔡德海,陈虹,董小青,等. 核桃外皮的抗真菌作用研究[J]. 武警医学,2006,17(4):266-267.
- [7] 杜旭,王明晶,姜力伟,等. 中药青龙衣镇痛作用机理的研究[J]. 中国中医药科技,1997,4(3):155-156.
- [8] 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.
- [9] 冯俊涛,石勇强,张兴. 56种植物抑菌活性筛选试验[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2001,29(2):65-68.
- [10] 吴文君. 植物化学保护实验技术导论[M]. 西安:陕西科学技术出版社,1987:141-145.