

## 黄山木兰精油对 9 种植物病原真菌的抑菌活性

史冬辉<sup>1</sup>, 刘洪波<sup>1</sup>, 杨小丰<sup>1</sup>, 张瑜<sup>2</sup>, 陈安良<sup>1</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:** 采用生长速率法和番茄 *Lycopersicon esculentum* 活体组织法对黄山木兰 *Magnolia cylindrica* 精油对植物病原菌的活性进行了测定。离体抑菌实验表明: 在 500  $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$  下黄山木兰精油对多种真菌有明显的抑制活性, 以对苹果腐烂病菌 *Valsa mali* 和小麦赤霉病菌 *Fusarium gramineum* 的抑制率较高, 分别为 95.23% 和 93.83%。筛选 6 种对黄山木兰精油较为敏感的病原真菌进行菌丝生长抑制作用测定, 结果表明, 黄山木兰对 6 种真菌的抑制中浓度 ( $\text{EC}_{50}$ ) 为 147.94 ~ 223.73  $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ , 其中对苹果腐烂病菌的活性最强, 对油菜菌核病菌 *Sclerotinia sclerotiorum* 的活性最弱。番茄活体组织接种实验表明, 1 000  $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$  的黄山木兰精油对番茄灰霉病 *Botrytis cinerea* 的治疗和保护作用优于 500  $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$  的精油溶液和 100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的三唑酮溶液。黄山木兰精油具有较强的抑菌活性。表 3 参 15

**关键词:** 森林保护学; 黄山木兰; 植物精油; 植物病原真菌; 抑菌活性

中图分类号: S763.1 文献标志码: A 文章编号: 1000-5692(2009)02-0223-05

## Antifungal activity of the essential oil from *Magnolia cylindrica* on nine phytopathogenic fungi

SHI Dong-hui<sup>1</sup>, LIU Hong-bo<sup>1</sup>, YANG Xiao-feng<sup>1</sup>, ZHANG Yu<sup>2</sup>, CHEN An-liang<sup>1</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:** To exploit plant essential oils as botanical fungicides. The essential oil from *Magnolia cylindrica* was evaluated for its antifungal activity in vitro by using mycelial growth rate method on nine fungi: *Rhizoctonia solani*, *Alternaria solani*, *Valsa mali*, *Fusarium gramineum*, *Bipolaris maydis*, *Exserohilum turcicum*, *Fusarium oxysporum* f. *vasinfectum*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. In addition, protective and curative effect of the *M. cylindrica* oil against *B. cinerea* on tomato was tested in vivo. In vitro the results showed that the essential oil of *M. cylindrica* at 500  $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$  was highly antifungal on the most of the tested fungi. Inhibition rates to the oil from the most sensitive fungi were 95.23% (*V. mali*) and 93.83% (*F. gramineum*). The half maximal effective concentration ( $\text{EC}_{50}$ ) of six sensitive fungi ranged from 147.94 (*V. mali*) to 223.73  $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$  (*S. sclerotiorum*). In vivo with tomato, the concentration of the *M. cylindrica* oil at 1 000  $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$  had higher efficiency on *B. cinerea* than did of 500  $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$  oil and 100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  triadimefon. This study indicated that the essential oil of *M. cylindrica* had a high antifungal efficacy, however, further study was needed to provide experimental data for development of botanical fungicides from essential oils of *M. cylindrica* and other woody plants. [Ch, 3 tab. 15 ref.]

**Key words:** forest protection; *Magnolia cylindrica*; plant essential oil; phytopathogenic fungus; antifungal activity

收稿日期: 2008-05-07; 修回日期: 2008-11-06

基金项目: 浙江省重大科技攻关项目(2005C12022)

作者简介: 史冬辉, 从事生物农药研究。E-mail: sdh@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

植物源农药与传统化学农药相比,因具有环境相容性好、生物活性多样、有害生物不易产生抗性、对高等动物和害虫天敌及农作物安全等特点<sup>[1]</sup>,成为农药发展关注的焦点之一<sup>[2]</sup>。植物精油在医学、日化产品和食品添加剂等方面有广泛应用<sup>[3-6]</sup>。近年来的研究表明,多种植物精油对植物病原菌具有抑菌、杀菌等作用<sup>[7-10]</sup>,有开发为对环境友好型作物保护剂的潜力。目前,有些产品已成功登记上市<sup>[9-10]</sup>。笔者研究了黄山木兰 *Magnolia cylindrica* 精油对植物病原真菌的抑菌活性,以期开发木本植物精油作为植物源杀菌剂提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试样品

黄山木兰精油制备:实验所用黄山木兰叶子采自浙江林学院校园内,新鲜叶子室内自然阴干后,在40℃烘箱中烘干,用粉碎机粉碎,采用水蒸气蒸馏装置蒸馏提取精油。收集的精油以无水硫酸钠干燥后瓶装,于4℃下保藏备用。

番茄 *Lycopersicon esculentum*: 市购,用自来水清洗,晾干备用。

### 1.2 供试菌种及其培养基

水稻纹枯病菌 *Rhizoctonia solani*, 番茄早疫病菌 *Alternaria solani*, 苹果腐烂病菌 *Valsa mali*, 小麦赤霉病菌 *Fusarium gramineum*, 玉米小斑病菌 *Bipolaris maydis*, 玉米大斑病菌 *Exserohilum turcicum*, 棉花枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* f. *vasinfectum*, 油菜菌核病菌 *Sclerotinia sclerotiorum*, 番茄灰霉病菌 *Botrytis cinerea*, 均由浙江林学院森林保护实验室提供;培养基采用马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)。

### 1.3 药剂配置

在无菌条件下,按照黄山木兰精油与吐温1:6配比,用无菌水配制500,1000,2000,3000,4000,5000,6000  $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$  不同的精油溶液,同时配制相应比例的吐温溶液。

三唑酮溶液由三唑酮药剂加清水稀释配制,质量浓度为100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

### 1.4 抑菌生物活性测定

1.4.1 离体抑菌实验 ①含黄山木兰精油培养基制备及接种。在无菌条件下,移取1 mL上述精油溶液与9 mL 50℃左右的马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)依次倒入直径为9 cm的培养皿,充分混匀后作为处理组,得到培养基中精油溶液体积分数为100~600  $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$  的不同梯度。用同样方法,以含相应比例的吐温溶液的培养基作为对照组。

取PDA培养基上菌丝均匀布满培养基表面的供试菌种,用直径为5 mm的无菌打孔器在菌落边缘切取菌饼,用无菌镊子将菌饼分别接种至冷却后的处理组和对照组培养基中,处理组和对照组3次重复,每个培养皿接种菌饼1块,置26℃的生化培养箱内培养,待对照组中的菌丝长满培养皿后,测量处理组和对照组菌落直径,计算处理组对真菌生长的抑制百分率。②抑菌作用计算方法。采用生长速率法<sup>[11]</sup>判定药剂毒力大小,按交叉法测量菌落直径2次,取其平均值为菌落的大小,精油抑菌百分率计算公式:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{(\text{对照组菌落的平均直径} - \text{处理组菌落的平均直径})}{\text{对照组菌落的平均直径} - \text{菌饼直径}} \times 100。$$

根据不同配比的抑制率,将抑制率换算成几率值( $y$ ),药剂体积分数( $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ )换成对数值( $x$ ),采用SPSS 11.5软件分析,求出毒力回归方程( $y = b + ax$ ),计算出对病原菌的抑制中浓度  $\text{EC}_{50}$ 。

1.4.2 番茄活体组织法抑菌实验 ①保护作用测定。在番茄表面均匀涂上配制好的药剂,晾干后在番茄上用针在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3个番茄,接好菌后放入温度为20℃,湿度为90%的培养箱中培养。精油溶液设500  $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$  和1000  $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$  2个处理组,以相应比例的吐温溶液作为对照;另设100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  三唑酮溶液为处理组,以清水作为对照。4~5 d后按交叉法测量病菌直径2次取其平均值,求得防治效果。

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\text{对照组病菌平均直径} - \text{处理组病菌平均直径}}{\text{对照组病菌平均直径} - \text{菌饼直径}} \times 100。$$

②治疗作用测定。具体方法同①。不同点在于先在番茄上接入菌饼, 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。

### 1.5 统计分析

采用 SPSS 11.5 软件进行数据处理。

## 2 结果与分析

### 2.1 黄山木兰精油对植物病原真菌的离体抑制作用

首先, 进行了在 500  $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$  精油对 9 种植物病原真菌的抑制作用, 结果见表 1。

表 1 500  $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$  黄山木兰精油溶液对 9 种植物病原真菌的抑制率

Table 1 Inhibition rates of the essential oil of *Magnolia cylindrica* against 9 phytopathogenic fungi at the concentration of 500  $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$

病原菌名	抑制率/%	病原菌名	抑制率/%	病原菌名	抑制率/%
水稻纹枯病菌	71.35	番茄早疫病菌	19.63	番茄灰霉病菌	75.57
小麦赤霉病菌	93.83	油菜菌核病菌	85.56	玉米小斑病菌	63.56
苹果腐烂病菌	95.23	玉米大斑病菌	53.35	棉花枯萎病菌	85.59

说明: 精油溶液作为处理组, 吐温溶液作为对照组。

从表 1 可见, 在 500  $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$  下, 精油对 8 种植物病原真菌的抑制率在 50% 以上, 表现出一定的广谱性, 其中对苹果腐烂病菌和小麦赤霉病菌的抑制率较高, 抑制率在 90% 以上; 对棉花枯萎病菌、油菜菌核病菌、番茄灰霉病菌和水稻纹枯病菌的抑制率均在 70% 以上; 对玉米小斑病菌和玉米大斑病菌的抑制率在 60% 左右; 对番茄早疫病菌的抑制作用较弱。

在此基础上对水稻纹枯病菌、油菜菌核病菌、番茄灰霉病菌、小麦赤霉病菌、苹果腐烂病菌和棉花枯萎病菌进行菌丝生长毒力作用测定, 结果见表 2。

表 2 黄山木兰精油溶液对 6 种植物病原真菌的毒力测定结果

Table 2 Toxicity of the essential oil from *Magnolia cylindrica* to 6 phytopathogenic fungi

病原菌名	毒力回归方程	相关系数	EC <sub>50</sub> /( $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ )
苹果腐烂病菌	$y = -1.451 0 + 2.972 7x$	0.976 7**	147.94
小麦赤霉病菌	$y = -3.3 778 + 3.601 9x$	0.973 1**	211.82
棉花枯萎病菌	$y = -2.296 1 + 3.140 9x$	0.989 4**	210.34
油菜菌核病菌	$y = -3.081 7 + 3.439 4x$	0.971 6**	223.73
番茄灰霉病菌	$y = 0.903 9 + 1.767 8x$	0.980 3**	207.51
水稻纹枯病菌	$y = 2.240 2 + 1.234 4x$	0.991 0**	172.06

说明: \*\* 表示  $P < 0.01$ 。

从表 2 可见, 黄山木兰精油溶液对 6 种植物病原真菌的 EC<sub>50</sub> 值为 147.94 ~ 223.73  $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ , 从小到大排序为苹果腐烂病菌 < 水稻纹枯病菌 < 番茄灰霉病菌 < 棉花枯萎病菌 < 小麦赤霉病菌 < 油菜菌核病菌。

### 2.2 黄山木兰精油对番茄灰霉病的活体抑制作用

进行了黄山木兰精油对番茄灰霉病的活体抑制作用测定。治疗和保护 2 种作用方式的测定结果见表 3。

从表 3 可见, 各药剂的治疗和保护作用排序: 精油 1 000  $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$  溶液 > 100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  三唑酮溶液 >

精油 500  $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$  溶液。

### 3 结论与讨论

黄山木兰精油对在离体条件下的植物病原真菌具有较强的抑菌活性, 具有广谱性; 在不同病原真菌之间, 抑制作用具有一定的差异性。在 500  $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$  下, 对苹果腐烂病菌和小麦赤霉病菌的抑制效果最佳, 抑制率达 90% 以上; 对抑制率在 70% 以上的 6 种病原真菌进行毒力作用测定, 以苹果腐烂病菌和水稻纹枯病菌的  $\text{EC}_{50}$

最小, 均在 200  $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$  以内。番茄活体组织法实验显示黄山木兰精油对番茄灰霉病具有一定治疗和保护效果, 在 1 000  $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$  下其治疗和保护效果优于 500  $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$  的精油溶液和 100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的三唑酮溶液, 表明该精油的防治效果随体积分数的增加而增强的。

黄山木兰精油主要成分为  $\beta$ -蒎烯(33.45%), 柠檬烯(8.54%),  $\alpha$ -蒎烯(8.16%), 1, 8-桉叶素(7.96%), 月桂烯(5.19%)等<sup>[12]</sup>。有文献报道<sup>[13]</sup>,  $\alpha$ -蒎烯对白念珠菌 *Candida albicans* 有明显的抑菌和杀菌作用, 柠檬烯对很多细菌和真菌都具有较强的抗菌活性<sup>[14]</sup>。因此, 黄山木兰精油对植物病原真菌的抑菌活性很可能与  $\alpha$ -蒎烯和柠檬烯有关。因此, 有必要对这 2 种物质进行抑菌活性测定, 分析精油中起作用的物质。同时应在活体生物活性测定、大田实验及作用机制等方面进行深入研究, 为开发精油杀菌剂提供依据。

黄山木兰是中国特有树种, 其花蕾有一定的药用价值<sup>[15]</sup>, 如能将其精油开发成新颖的植物源杀菌剂, 必将对黄山木兰的栽培和保护起到作用。

### 参考文献:

- [1] 张雁冰, 艾国民, 刘宏民, 等. 植物源农药的研制及其开发现状[J]. 河南农业科学, 2005 (5): 30 - 32.  
ZHANG Yanbing, AI Guomin, LIU Hongmin, *et al.* Current state of research and development in botanical pesticides [J]. *J Henan Agric Sci*, 2005(5): 30 - 32.
- [2] 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.
- [3] 顾仁勇, 刘莹莹. 山苍子精油抑菌及抗氧化作用的研究[J]. 食品科学, 2006, 27 (11): 86 - 88.  
GU Renyong, LIU Yingying. Study on the anti-oxidation and bacteriostasis of *Litsea cubeba* extraction oil[J]. *Food Sci*, 2006, 27 (11): 86 - 88.
- [4] 陈海敏, 胡秀芳, 竺锡武, 等. 植物复方精油熏蒸杀菌效果研究[J]. 中国消毒学杂志, 2006, 23 (2): 136 - 137.  
CHEN Haimin, HU Xiufang, ZHU Xiwu, *et al.* Study on germicidal efficacy of fumigation with plant compound essential oils[J]. *Chin J Disinfect*, 2006, 23 (2): 136 - 137.
- [5] 疏秀林, 施庆珊, 欧阳友生, 等. 植物精油的抗菌特性及在食品工业中应用研究新进展[J]. 生物技术, 2006, 16 (6): 89 - 92.  
SHU Xiulin, SHI Qingshan, OUYANG Yousheng, *et al.* New developments of the antimicrobial activities of essential oils and its application in food industry[J]. *Biotechnology*, 2006, 16 (6): 89 - 92.
- [6] 吕永, 何庭玉, 陈珊. 互叶白千层植物精油的研究进展[J]. 广东化工, 2005 (3): 38 - 40.  
LU Yong, HE Tingyu, CHEN Shan. Review of volatile oil from *Melaleuca alternifolia* [J]. *Guangdong Chem Ind*, 2005 (3): 38 - 40.
- [7] MO Xiaolu, WANG Yusheng, ZENG Qingqian, *et al.* Antifungal activity study of several essential oils [J]. *Nat Prod Res Dev*, 2005, 17 (6): 696 - 699.

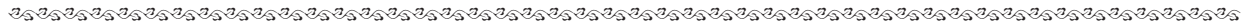
表 3 黄山木兰精油溶液对番茄灰霉病的治疗和保护作用测定结果

Table 3 Curative and protective effect of the essential oil from *Magnolia cylindrica* to *Botrytis cinerea* on tomato

作用方式	黄山木兰精油/ $(\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1})$		三唑酮/ $(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$
	500	1 000	100
治疗作用	36.36 c	55.21 a	49.69 b
保护作用	22.17 c	41.32 a	25.23 b

说明: 1. 精油溶液和三唑酮的抑制率分别以吐温溶液和清水作为对照。  
2. a, b, c 表示同行数据 Tukey 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。

- [8] SHAHI S K, PATRA M, SHUKLA A C, *et al.* Use of essential oil as botanical-pesticide against post harvest spoilage in *Malus pumilo* fruits[J]. *Bio Control*, 2003, **48**: 223 – 232.
- [9] 刘学文, 徐汉虹, 鞠荣, 等. 植物精油在农药领域中的研究进展[J]. 香料香精化妆品, 2004 (2): 36 – 39.  
LIU Xuewen, XU Hanhong, JU Rong, *et al.* Advance of plant essential oils research in pesticide[J]. *Flavour Fragrance Cosmet*, 2004 (2): 36 – 39.
- [10] 吴佩文. 植物精油类农药[J]. 世界农药, 1999, **21** (6): 23 – 26.  
WU Peiwen. Pesticides based on plant essential oils[J]. *World Pestic*, 1999, **21** (6): 23 – 26.
- [11] 黄国洋. 农药试验技术与评价方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 30 – 31.
- [12] 胡一民, 武组发. 几种辛夷的挥发油成分及其繁殖栽培[J]. 林业科技通讯, 1995 (3): 41 – 42.  
HU Yimin, WU Zufa. Constituents of volatile oils from several Xinyi plants and their propagation and cultivation[J]. *For Sci Technol*, 1995 (3): 41 – 42.
- [13] 夏忠弟, 毛学政, 罗映辉.  $\alpha$ -蒎烯抗真菌机制的研究[J]. 湖南医科大学学报, 1999, **24** (6): 507 – 509.  
XIA Zhongdi, MAO Xuezheng, LUO Yinghui. Study on antifungal mechanism of  $\alpha$ -pinene[J]. *Bull Hunan Med Univ*, 1999, **24** (6): 507 – 509.
- [14] 王伟江. 天然活性单萜——柠檬烯的研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2005 (1): 33 – 37.  
WANG Weijiang. Recent advances on limonene, a natural and active monoterpene[J]. *China Food Addit*, 2005 (1): 33 – 37.
- [15] 张纪卯. 黄山木兰造林技术[J]. 福建林业科技, 1999, **26** (1): 74 – 77.  
ZHANG Jimao. The planting techniques of *Magnolia cylindrica*[J]. *J Fujian For Sci Technol*, 1999, **26** (1): 74 – 77.



## 浙江省森林碳汇研究重点实验室建设可行性方案通过专家论证

2008 年 11 月 29 日, 浙江省科学技术厅组织专家在浙江林学院对拟建的“浙江省森林碳汇研究重点实验室”建设方案进行了论证。

专家组听取了汇报, 考察了实验室现场, 经质疑和讨论, 一致认为该重点实验室的建设密切结合国家应对气候变化和节能减排要求及浙江省经济社会发展的需求, 在科学研究上突出减缓全球气候变暖和增强森林生态系统碳汇能力的国际热点问题, 有重要的理论意义和实践价值。重点实验室设置的森林生态系统固碳机制、碳汇计量系统开发、碳汇提升技术和森林产品碳平衡等 4 个研究方向, 针对浙江省阔叶林、针叶林、竹林等主要森林类型开展研究, 方向正确, 建设目标明确。学校、学院、学科为重点实验室的森林碳汇研究提供了人、财、物等的重要保障。通过该重点实验室的建设, 可提高浙江省乃至我国森林碳汇研究水平, 将在浙江林学院形成一个特色鲜明、实力雄厚的森林碳汇研究平台, 有望在森林碳汇计量和提升技术及森林碳库研究方面整体达到国内领先水平。

余学军