

山核桃外果皮提取物活体抑菌活性

马良进¹, 吴美卿², 苏秀¹, 陈安良¹, 张立钦¹

(1. 浙江林学院 林业与生物技术学院, 浙江 临安 311300; 2. 浙江省东阳市白云街道办事处 林业工作站, 浙江 东阳 322100)

摘要: 利用山核桃 *Carya cathayensis* 外果皮甲醇提取物对黄瓜灰霉病菌 *Botrytis cinerea*, 小麦白粉病菌 *Erysiphe graminis*, 黄瓜白粉病菌 *Sphaerotheca fuliginea* 和黄瓜霜霉病菌 *Pseudoperonospora cubensis* 进行了预防性和治疗性的室内盆栽药效试验。结果表明: 质量浓度为 $0.100\ 0\ \text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的干样山核桃外果皮甲醇提取物对黄瓜灰霉病菌保护作用和治疗作用的菌丝生长抑制率分别为 85.40% 和 36.72%; 对小麦白粉病菌保护作用和治疗作用的防治效果分别为 75.00% 和 66.67%; 室内盆栽黄瓜白粉病预防效果达到 62.96%, 治疗作用达到 74.07%; 对黄瓜霜霉病的保护作用效果达到 56.62%, 治疗效果为 23.08%。山核桃外果皮甲醇提取物具有一定的活体抑菌活性, 利用山核桃外果皮开发植物源农药值得进一步研究。表 4 参 10

关键词: 森林保护学; 山核桃; 外果皮提取物; 植物源农药; 抑菌活性; 抑制效果

中图分类号: S789.5; Q946.8 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-5692(2009)05-0620-05

Antifungal activity in vitro with extracts from the husk of *Carya cathayensis*

MA Liang-jin¹, WU Mei-qing², SU Xiu¹, CHEN An-liang¹, ZHANG Li-qin¹

(1. School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 2. Forest Station, Baiyun Street Office of Dongyang City, Dongyang 322100, Zhejiang, China)

Abstract: Antifungal metabolites from plant, as known to be friendly to environment, have been widely screened for the potential pesticides. In this study, extract from the husk of *Carya cathayensis* using methanol was tested against *Botrytis cinerea*, *Sphaerotheca fuliginea*, *Erysiphe graminis*, and *Pseudoperonospora cubensis* on potted plants. Preventive effects and curative effects of the extracts were determined based on the disease indexes comparing to the control. Results showed that the extract from *C. cathayensis* husk at $0.10\ \text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ had 85.40% preventive effect and 36.72% curative effect against *B. cinerea*, 75.00% preventive effect and 66.67% curative effect against *E. graminis*, 62.96% preventive effect and 74.07% curative effect against *S. fuliginea*, and 56.62% preventive effect and 23.08% curative effect against *P. cubensis*. The significant antifungal activities against these fungi intrigue us to further research on chemicals in the extracts from husk of *C. cathayensis*. [Ch, 4 tab. 10 ref.]

Key words: forest protection; *Carya cathayensis*; husk extracts; phytochemical pesticide; antifungal activity; inhibited effect

山核桃 *Carya cathayensis* 是胡桃科 Juglandaceae 山核桃属 *Carya* 植物, 系国家三级保护的濒危植物^[1]。山核桃叶的乙醇和水提取物对金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*, 大肠杆菌 *Escherichia coli*, 酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae*, 黑曲霉菌 *Aspergillus niger*, 黄曲霉菌 *Aspergillus flavus* 和青霉菌 *Penicillium* sp. 等有一定的抑制效果^[2]。山核桃外果皮是一种废弃的有毒物质, 其成分主要有生物

收稿日期: 2008-11-25; 修回日期: 2009-02-17

基金项目: 浙江省重大科技攻关项目(2005C12022)

作者简介: 马良进, 副教授, 博士, 从事森林病理学与生物防治研究。E-mail: malj@zjfc.edu.cn

碱、酚类化合物、鞣质、皂苷、甾体和萜醌类等可作为植物性农药的化合物成分，是一种很有开发潜力的植物源杀菌剂的原材料。山核桃外果皮的甲醇提取物对黄瓜灰霉病菌 *Botrytis cinerea*，番茄早疫病菌 *Alternaria solani* 和黄瓜炭疽病菌 *Colletotrichum lagenarium* 等 15 种植物病原真菌有一定的抑制作用^[3]。目前，山核桃外果皮提取物在活体植物上的抑菌活性还未见报道，作者研究了山核桃外果皮提取物对 4 种植物病原菌的活体抑菌效果，为合理利用山核桃外果皮资源奠定基础。

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开发有限公司提供，为 2006 年 9 月初山核桃收获季节采集的新鲜外果皮。

1.2 供试病原菌及供试寄主

供试病原真菌为黄瓜灰霉病菌 *Botrytis cinerea*，黄瓜白粉病菌 *Sphaerotheca fuliginea*，小麦白粉病菌 *Erysiphe graminis* 和黄瓜霜霉病菌 *Pseudoperonospora cubensis*，均由浙江省化工研究院提供。

1.3 盆栽试验中供试寄主及对照试剂

供试寄主：黄瓜 *Cucumis sativus* (津研 4 号)；小麦 *Triticum aestivum* (陕优 225)。供试对照试剂：64% 恶霜·锰锌可湿性粉剂 (oxadixyl mancozeb，杭州邦化进出口有限公司) 2 000 mg·L⁻¹，20% 三唑酮乳油 (triazimefon，盐城强盛化工有限公司) 1 000 倍稀释液。

1.4 主要仪器与试剂

仪器：Eyela 旋转蒸发仪，Sartorius 电子天平，人工气候箱，超纯水器，Sanyo 超净工作台。试剂：甲醇 (分析纯，杭州大方化学试剂厂)，无水 500 号乳化剂和 601 号乳化剂 (邢台蓝星助剂厂)。

1.5 提取方法

将山核桃外果皮在烘箱里 (50 ℃) 烘干，粉碎，过 0.25 mm 筛，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，浓缩成浸膏，浸膏称量后于冰箱中 (0 ~ 4 ℃) 冷藏备用^[4]。

1.6 山核桃外果皮提取物盆栽试验乳油制剂的制备

1.000 0 g 山核桃甲醇提取浸膏加 0.020 0 g 无水 500 号乳化剂和 0.080 0 g 601 号乳化剂，用适量自来水稀释，使最终质量浓度为 1.000 0 g·mL⁻¹ (干样)。

1.7 山核桃外果皮提取物盆栽试验的测定方法

1.7.1 防治黄瓜灰霉病的盆栽试验 采用菌丝法^[5]。盆栽育苗，待苗长至 1 叶期备用。黄瓜灰霉病菌的培养：将灰霉病菌菌丝块接种于注有 18 mL 马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 培养基的 9 cm 平皿中，置于 21 ℃ 生化培养箱中培养 2 d 备用；将山核桃外果皮甲醇提取物制剂用自来水稀释成 0.100 0，0.020 0 g·mL⁻¹ 等 2 个质量浓度梯度。① 保护作用：用接种针将每一片黄瓜真叶都刺上一个三角形的伤口，喷上不同质量浓度的药剂，各质量浓度 3 盆，并设清水为对照。待药剂晾干后，用直径 4 mm 的打孔器在已长好灰霉病菌的培养皿边缘切取菌落圆块，然后贴到药剂处理过的瓜苗叶片伤口上，置 20 ℃，95% 相对湿度的人工智能培养箱中，3 d 后调查发病情况，用游标卡尺量取霉斑直径，然后与对照相比，计算防治效果。② 治疗作用：先接菌，保湿培养 24 h 后喷药剂，其余同保护作用。以下列公式计算防治效果：

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\text{对照霉斑直径} - \text{处理霉斑直径}}{\text{对照霉斑直径}} \times 100。$$

1.7.2 防治小麦白粉病的盆栽试验 将山核桃外果皮甲醇提取物乳油制剂用自来水稀释成 0.100 0，0.020 0 g·mL⁻¹ 等 2 个质量浓度梯度。对照药剂的配制：将三唑酮按照 1 : 1 000 的比例溶解于蒸馏水中，摇匀放入 4 ℃ 冰箱内保存。① 保护作用：无菌土育苗，待小麦长出 2 叶时用小型喷雾器将药剂喷于叶片表面，喷液量为 0.55 mL·cm⁻²，待药液晾干后采用孢子抖动法^[6]接种，各质量浓度 3 盆，并设清水和三唑酮药剂为对照，然后放入人工智能培养箱中培养 (18 ℃，光 14 h : 暗 10 h 交替，75% 相对湿度)。② 治疗作用：先接菌，人工智能培养箱中培养 24 h 后喷药，其余同保护作用。小麦白粉病病

情分级标准参照方中达方法^[7]。0级：叶面无病斑；1级：叶片上只有少量的菌丝体，无孢子；2级：叶面菌丝体量中等，有一些孢子，组织轻微坏死或褪绿；3级：菌丝体的量中等或很多，孢子产生的量有限，有一些坏死和褪绿；4级：孢子堆很大，产生大量孢子，有坏死和褪绿。

1.7.3 防治黄瓜白粉病的盆栽试验 将山核桃外果皮甲醇提取物乳油制剂用自来水稀释成 0.100 0, 0.050 0, 0.025 0, 0.016 7, 0.012 5 g·mL⁻¹ 等 5 个质量浓度梯度，设清水和三唑酮药剂为对照。分生孢子悬浮液的制备：采集黄瓜植株叶片上新鲜的分生孢子，用无菌水冲洗，制成分生孢子悬浮液(8 × 10⁴ ~ 10 × 10⁴ 个·mL⁻¹)。从分生孢子悬浮液制备至完成接种应限定在 2 h 内。①保护作用：取第 1 张真叶刚展开时的黄瓜幼苗，用小型喷雾器将药剂喷于叶片表面，喷液量为 0.55 mL·cm⁻²，设置清水处理和对照药剂处理，3 株·处理⁻¹，3 次重复。待药液晾干后，用喷雾法接种分生孢子悬浮液，接种后在室内进行培养，10 d 后根据发病面积制定分级标准调查发病程度，计算病情指数和防效。②治疗作用：先接菌，培养 24 h 后喷药，其余同保护作用^[8]。分级标准参考《GB/T 17980.30 - 2000 农药田间药效试验准则(一)杀菌剂防治黄瓜白粉病》。0级：无病斑；1级：病斑面积占整片叶面积的 6% 以下；2级：病斑面积占整片叶面积的 6% ~ 10%；3级：病斑面积占整片叶面积的 11% ~ 20%；4级：病斑面积占整片叶面积的 21% ~ 40%；5级：病斑面积占整片叶面积的 40% 以上。

1.7.4 防治黄瓜霜霉病的盆栽试验 将山核桃外果皮甲醇提取物乳油制剂用自来水稀释成 0.100 0, 0.020 0 g·mL⁻¹ 等 2 个质量浓度梯度。①保护作用：盆栽育苗，待长有 2 片叶子(真叶)时，用小型喷雾器将药剂喷于叶片表面，喷液量为 0.55 mL·cm⁻²，2 h 后采用常规喷雾法接种，接种质量浓度为显微镜 10 × 10 倍下每视野 10 ~ 15 个孢子囊，同时设单接菌和 64% 噁霜·锰锌可湿性粉剂 2 000 mg·L⁻¹ 为对照。3 株·处理⁻¹，3 次重复。接种后放入人工智能培养箱中培养(19 ℃，光 14 : 暗 10 交替，95% 相对湿度)，10 d 后进行病情调查。②治疗作用：先接菌，保湿培养 24 h 后喷药，其余同保护作用。黄瓜霜霉病病情分级标准参照余国辉方法^[9]。0级：无病；1级：病部占全叶面积的 25% 以下；2级：病部占全叶面积的 25% ~ 50%；3级：病部占全叶面积的 50% ~ 75%；4级：病部占全叶面积的 75% 以上。计算盆栽试验的病情指数和防治效果公式如下。

$$\text{病情指数} = \frac{\sum (\text{某病级病株数或病叶数} \times \text{某病级代表数值})}{\text{调查总株数或叶数} \times \text{最高病级代表数值}} \times 100。$$

$$\text{防治效果}(\%) = \frac{\text{对照病情指数} - \text{处理病情指数}}{\text{对照病情指数}} \times 100。$$

2 结果与分析

2.1 黄瓜灰霉病盆栽试验测定结果

采用菌丝法测定了山核桃外果皮甲醇提取物对黄瓜叶片上形成的灰霉菌的霉斑生长抑制作用，结果(表 1)表明，在供试质量浓度为 0.100 0 g·mL⁻¹(干样)时，山核桃外果皮甲醇提取物对黄瓜灰霉病保护作用和治疗作用的霉斑扩展抑制率分别为 85.40% 和 36.72%；在供试质量浓度为 0.020 0 g·mL⁻¹(干样)时，山核桃外果皮甲醇提取物对黄瓜灰霉菌保护作用和治疗作用的菌丝生长抑制率分别为 49.80% 和 30.16%。

2.2 小麦白粉病盆栽试验测定结果

采用孢子抖动法测定了山核桃外果皮甲醇提取物对小麦白粉病粉斑扩展抑制作用，结果(表 2)表明，在供试质量浓度为 0.100 0 g·mL⁻¹(干样)时，山核桃外果皮甲醇提取物对小麦白粉病菌保护作用

表 1 山核桃外果皮甲醇提取物对室内盆栽黄瓜苗灰霉病的防治效果

Table 1 Inhibition effect of extracts from the husk of *Carya cathayensis* to *Botrytis cinerea* on potted plants

处理质量浓度/(g·mL ⁻¹)	抑制率/%	
	保护作用	治疗作用
0.100 0	85.40	36.72
0.020 0	49.80	30.16

和治疗作用的防治效果分别为 75.00% 和 66.67%，极显著优于供试质量浓度为 0.020 0 g·mL⁻¹(干样)时的防治效果。但是，对照药剂的防效明显优于供试质量浓度为 0.100 0 g·mL⁻¹(干样)时的防效。

表 2 山核桃外果皮甲醇提取物对室内盆栽小麦苗白粉病的防治效果

Table 2 Inhibition effect of extracts from the husk of *Carya cathayensis* to wheat powder mildew on potted plants

处理质量浓度/(g·mL ⁻¹)	病情指数		防治效果/%		差异显著性	
	保护作用	治疗作用	保护作用	治疗作用	$\alpha = 0.05$	$\alpha = 0.01$
0.100 0	25.00	33.33	75.00	66.67	b	B
0.020 0	58.33	66.67	41.67	33.33	c	C
对照药剂	12.40	12.40	87.60	87.60	a	A
清水	100	100			d	D

2.3 黄瓜白粉病盆栽试验测定结果

山核桃外果皮甲醇提取物对室内盆栽黄瓜苗白粉病防治效果的试验结果(表 3)表明，清水对照在处理 10 d 后病情指数很高，黄瓜叶片出现了明显的感病症状，而山核桃外果皮甲醇提取液的 10 倍和 20 倍提取物的病情指数仍极显著低于对照黄瓜苗，但是山核桃外果皮甲醇提取物 40、60 和 80 倍提取物的病情指数与清水对照差不多。这说明，高质量浓度的山核桃外果皮甲醇提取物对黄瓜白粉病仍保持较好的防效[在供试质量浓度为 0.100 0 g·mL⁻¹(干样)时，对黄瓜白粉病的预防效果达 62.96%，治疗效果达 74.07%；在供试质量浓度为 0.050 0 g·mL⁻¹(干样)时，对黄瓜白粉病的预防效果达到 51.85%，治疗效果达到 51.85%]；较低质量浓度山核桃外果皮甲醇提取物对黄瓜白粉病几乎没有防治效果。

表 3 10 d 后山核桃外果皮甲醇提取物对室内黄瓜盆栽苗白粉病的防治效果

Table 3 Inhibition effect of extracts from the husk of *Carya cathayensis* to cucumber powder mildew on potted plants after 10 days

处理质量浓度/(g·mL ⁻¹)	病情指数		防治效果/%		差异显著性	
	保护作用	治疗作用	保护作用	治疗作用	$\alpha = 0.05$	$\alpha = 0.01$
0.100 0	37.04	25.93	62.96	74.07	b	B
0.020 0	48.15	48.15	51.85	51.85	c	C
0.025 0	77.78	70.37	22.22	29.63	d	D
0.016 7	85.19	85.19	14.81	14.81	e	E
0.012 5	88.89	92.59	11.11	7.41	e	E
对照药剂	9.12	9.12	90.88	90.88	a	A
清水	100	100			f	F

2.4 黄瓜霜霉病盆栽试验测定结果

表 4 表明，清水对照和山核桃外果皮提取物的 50 倍稀释液在处理 10 d 后黄瓜苗病情指数很高，黄瓜叶片出现了明显的感病症状，而山核桃外果皮甲醇提取物 10 倍稀释液的病情指数相对较小。这说明，较高质量浓度的山核桃外果皮甲醇提取物对黄瓜霜霉病有一定的防效，在供试质量浓度为 0.100 0 g·mL⁻¹(干样)时，对黄瓜霜霉病的保护作用效果达到 56.62%，治疗效果为 23.08%，极显著优于为 0.020 0 g·mL⁻¹(干样)的防效。高质量浓度提取物的治疗效果(23.08%)显然低于保护作用的效果。分析认为，内吸杀菌剂除少数几个品种，如甲霜灵外，大多数内吸杀菌剂对鞭毛菌引致的病害基本无效^[10]。山核桃甲醇提取物对黄瓜霜霉病的治疗作用差可能与此有关。

3 讨论

通过山核桃外果皮甲醇提取物室内盆栽药效实验的测定结果可以看出，山核桃外果皮甲醇提取物

表4 10 d后山核桃外果皮甲醇提取物对室内盆栽黄瓜苗霜霉病的防治效果

Table 4 Inhibition effect of extracts from the husk of *Carya cathayensis* to cucumber downy mildew on potted plants after 10 days

处理质量浓度/(g·mL ⁻¹)	病情指数/%		防治效果/%		差异显著性			
	保护作用	治疗作用	保护作用	治疗作用	$\alpha = 0.05$		$\alpha = 0.01$	
					保护作用	治疗作用	保护作用	治疗作用
0.100 0	35.00	62.50	56.92	23.08	b	b	B	B
0.020 0	66.67	80.00	17.94	1.54	c	c	C	C
对照药剂	11.25	10.14	86.15	87.52	a	a	A	A
清水对照	81.25	81.25			d	c	D	C

对黄瓜灰霉病菌、黄瓜白粉病菌、小麦白粉病菌和黄瓜霜霉病菌这4种植物病原真菌所致病害有一定的抑制效果, 提取物质量浓度越高, 抑菌活性越强。作为植物源杀菌物质, 本试验中山核桃外果皮甲醇提取物在低质量浓度下的抑菌作用还很有限, 并且对照药剂的防效要极显著优于提取物的防效。由于植物化学成分比较复杂, 仅用甲醇作为提取溶剂未必能将活性物质全部提取出来; 盆栽试验中所用制剂的配置方法也会影响提取物的防治效果, 如要进一步研究, 应尽量采用极性不同的溶剂, 用不同的方法提取, 并采用不同的制剂配置方法。利用山核桃外果皮研制植物源农药是变废为宝的举措, 本试验的研究结果为此奠定了基础。但是, 利用山核桃外果皮提取高效的杀菌物质、提取物的抑菌作用机制等方面均有待于进一步研究。

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] 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] 苏秀, 马良进, 陈安良, 等. 山核桃外果皮提取物抑菌活性的初步研究[J]. 浙江林学院学报, 2008, **25** (3): 355 - 358.
SU Xiu, MA Liangjin, CHEN Anliang, *et al.* Antifungal and antibacterial activity of extracts from the husk of *Carya cathayensis* [J]. *J Zhejiang For Coll*, 2008, **25** (3): 355 - 358.
- [4] 冯俊涛, 石勇强, 张兴. 56种植物抑菌活性的初步研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2001, **30** (1): 68 - 72.
FENG Juntao, SHI Yongqiang, ZHANG Xing. Screening studies on fungistasis of 56 plant extracts [J]. *J Northwest A & F Univ Nat Sci Ed*, 2001, **30** (1): 68 - 72.
- [5] 李永刚. 一种植物源杀菌剂的研制及其在番茄叶霉病防治中的作用[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2003.
LI Yonggang. *Development and Application of a Kind of Botanical Fungicide on Control of Tomato Leaf Mould* [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2003.
- [6] 张应烙. 孜然提取物抑菌活性的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2003.
ZHANG Yingluo. *Studies on Fungistatic Activity of Cuminum cyminum* [D]. Yangling: Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, 2003.
- [7] 方中达. 植病研究方法[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [8] 金素心, 顾振芳, 代光辉, 等. 植物提取液对黄瓜白粉病的抑菌活性筛选研究[J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2006, **24** (1): 48 - 53.
JIN Suxin, GU Zhenfang, DAI Guanghui, *et al.* Study on inhibition effects of plant extracts against cucumber powdery mildew [J]. *J Shanghai Jiaotong Univ Agric Sci*, 2006, **24** (1): 48 - 53.
- [9] 余国辉. 灭克防治黄瓜霜霉病田间药效[J]. 农药, 2002, **41** (2): 27.
YU Guohui. Field trails of mieke to downy mildew on cucumber [J]. *Pesticides*, 2002, **41** (2): 27.
- [10] 赵善欢. 植物化学保护[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 1999.