

# 欧美 107 杨树提取物体外对 植物病原真菌的抑制活性

周亚明, 刘浩, 钟灵允, 周立刚\*, 隋鹏, 郭泽建

(中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100193)

**摘要:** 制备了欧美 107 杨树枝条和叶的乙醇粗提物及不同极性溶剂的萃取部分, 并测定了它们对植物病原真菌的抑制活性。枝条和叶的乙醇粗提物对棉花枯萎病菌、小麦纹枯病菌、番茄早疫病菌、番茄枯萎病菌、黄瓜枯萎病菌、小麦赤霉以及玉米弯孢等 7 种植物病原真菌均具有一定的抑制作用。而枝条的乙醇粗提物对杨树溃疡病菌的菌丝生长有一定的促进作用。抗菌活性成分主要集中在乙酸乙酯萃取部分。

**关键词:** 杨树; 提取物; 植物病原真菌; 抗真菌活性; 乙酸乙酯萃取部分

中图分类号: S792.11; Q946.887 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2009)02-0275-04

## Inhibitory activity of extracts and fractions of *Populus × euramericana* on plant pathogenic fungi *in vitro*

ZHOU Ya-Ming, LIU Hao, ZHONG Ling-Yun,  
ZHOU Li-Gang\*, SUI Peng, GUO Ze-Jian

(College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

**Abstract:** The ethanol extracts and their different polar fractions from both young stems and leaves of *Populus × euramericana* Guineir cl. '74/76' were screened for antifungal activity against plant pathogenic fungi by using a mycelial radial growth inhibition method. The pathogenic fungi tested were *Alternaria solani*, *Curvularia lunata*, *Dothiorella gregaria*, *Fusarium graminearum*, *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *F. vasinfectum* and *Rhizoctonia cerealis*. All plant extracts and their fractions expressed antifungal activity except for the ethanol extract from young stems on *Dothiorella gregaria*, the pathogen of poplar stem rot. Ethyl acetate fraction showed higher antifungal activity than the others.

**Key words:** poplar; extracts; plant pathogenic fungi; antifungal activity; ethyl acetate fraction

杨树是杨柳科(Salicaceae)杨属(*Populus*)植物的统称,全世界有 100 余种,我国有 53 种,分布遍及全国(王战等,1984)。杨树为落叶乔木,是世界上分布最广、适应性最强的树种之一。杨树具有抗旱、耐寒、生长快、轮伐期短、纤维品质高等特点,在防风固沙、环境保护、水土保持、农田改良等方面起着十分

重要的作用,在工业和生活上具有多种用途(张鞍灵等,1998;周立刚等,2004;曹晓冬等,2005)。现代药理研究表明杨树具有抗病毒、抗菌、抗肿瘤、消炎、镇痛等活性(菅根柱,2006)。迄今,从杨属植物中分离鉴定出 90 多个化合物,有些化合物如:水杨酸酯、酚苷、黄酮等具有很好的生物活性(菅根柱,2006)。对

收稿日期: 2007-08-23 修回日期: 2008-10-29

基金项目: 河北省科学技术研究与发展计划项目(06220115D); 农业公益性行业科研专项(nyhyzx07-049); 国家科技支撑计划项目(2007BAD89B01)  
[Supported by the Program for Research and Development of Science and Technology of Hebei Province(06220115D); Commonwealth Specialized Research Fund of Chinese Agriculture(nyhyzx07-049); National Science and Technology Supporting Program of China(2007BAD89B01)]

作者简介: 周亚明(1981-),男,陕西韩城人,硕士研究生,研究方向为植物抗菌化合物。

\* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: lgzhou@cau.edu.cn)

杨树提取物抗植物病原真菌活性的研究尚未见报道,本研究以欧美 107 杨树的枝条和叶为材料,测定其乙醇粗提物及其不同溶剂萃取部分对植物病原真菌的抑制活性,为深入研究欧美 107 杨树的抗菌活性成分,以及资源的开发与利用提供依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 植物材料

欧美 107 杨树(*Populus × euramericana* (Dode) Guineir cl. '74/76')地上幼嫩部分于 2006 年 8 月采自河北省景县龙华镇。分成叶和去叶枝条两部分,在室内晾干。

### 1.2 供试微生物

供试植物病原真菌为:番茄早疫病菌(*Alternaria solani*)、玉米弯孢(*Curvularia lunata*)、杨树溃疡病菌(*Dothiorella gregaria*)、小麦赤霉(*Fusarium graminearum*)、黄瓜枯萎病菌(*F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*)、番茄枯萎病菌(*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*)、棉花枯萎病菌(*F. vasinfectum*)和小麦纹枯病菌(*Rhizoctonia cerealis*),真菌的活化和培养采用 PDA 培养基。以上菌株均由中国农业大学植物病理学系提供。

### 1.3 提取物和萃取组分的制备

枝条经粉碎后,取 900 g,用 95%乙醇(样品:乙醇=1:5,w/v)回流提取 1 h,重复 3 次,过滤,合并 3 次乙醇提取液,减压浓缩得乙醇粗提物(60.81 g,得率 6.76%)。参照本实验室的方法(李端等,2005;2006),制备不同极性溶剂的萃取部分,具体步骤如下:取乙醇粗提物(总浸膏)52.93 g,用蒸馏水加热溶解制成混悬液,依次用乙酸乙酯、正丁醇萃取,分别浓缩得到乙酸乙酯萃取部分(32.95 g,得率 4.21%)、正丁醇萃取部分(10.53 g,得率 1.34%),剩余的水溶液浓缩得水部分(8.21 g,得率 1.05%)。

叶粗提物及其萃取组分的制备同于枝条。取粉碎后的叶 400 g,回流提取得乙醇粗提物(84.83 g,得率 21.21%)。取乙醇粗提物(总浸膏)63.48 g,用蒸馏水加热溶解制成混悬液,依次用乙酸乙酯、正丁醇萃取,分别浓缩得到乙酸乙酯萃取部分(24.12 g,得率 8.06%)、正丁醇萃取部分(11.85 g,得率 3.96%),剩余的水溶液浓缩得水部分(20.87 g,得率 6.97%)。

### 1.4 抗真菌活性测定

提取物或萃取部分对真菌的抑制作用采用带毒

培养基—菌丝生长速率法(Mycelial radial growth inhibition method)(Quiroga 等,2001;周立刚,2005)。具体步骤如下:称量 25、100、200 mg 乙醇提取物或萃取部分,分别用 1 mL 有机溶剂溶解。针对不同的病原菌,溶解提取物或萃取部分的有机溶剂不同,针对小麦纹枯病菌、番茄早疫病菌、番茄枯萎病菌,用丙酮溶解;针对小麦赤霉、玉米弯孢、杨树溃疡病菌,用乙醇溶解;针对棉花枯萎病菌、黄瓜枯萎病菌,用二甲基亚砷溶解。在 PDA 培养基未凝固前(约 50 °C),将供试样液加入到 100 mL 培养基中,使供试样品在培养基中的浓度分别为 0.00、0.25、1.00、2.00 mg/mL,摇匀后迅速倒入培养皿( $\Phi=90$  mm)中,每皿 15 mL,放置待其凝固后,用接种针将菌饼( $\Phi=5$  mm)移到带毒培养基上,每皿正中央接一个菌饼,有菌丝的一面向下与培养基贴合,25 °C 下暗培养 2~7 d 后,当溶剂对照的菌落直径为培养皿直径的 80% 时,用十字交叉法测量菌落直径。实验设空白对照、溶剂对照和阳性对照(多菌灵,浓度 10  $\mu$ g/mL)、加药处理(植物提取物及萃取部分),每个处理设 3 个重复。用下述公式计算抑制率(计算抑制率时用对应的溶剂作对照):

$$\text{菌落扩展直径(mm)} = \text{菌落的平均直径(mm)} - 5 \text{ mm(菌饼直径)}$$

$$\text{相对抑制率(\%)} = [(\text{溶剂对照菌落扩展直径} - \text{处理菌落扩展直径}) / \text{溶剂对照菌落扩展直径}] \times 100\%$$

### 1.5 数据处理与统计分析

本实验均重复 3 次,每次各处理设 4 个重复,采用 Microsoft Excel 软件进行数据处理,计算平均值和标准差。

## 2 结果与分析

### 2.1 枝条和叶乙醇提取物对真菌菌丝生长的抑制作用

欧美 107 杨树枝条和叶的乙醇提取物对各供试真菌生长影响见表 1。枝条乙醇粗提物在浓度为 2 mg/mL 时对棉花枯萎病菌、小麦纹枯病菌、番茄早疫病菌、番茄枯萎病菌、黄瓜枯萎病菌、小麦赤霉以及玉米弯孢等 7 种植物病原真菌具有较好的抑制作用。枝条乙醇粗提物对杨树溃疡病菌菌丝的生长有一定的促进作用。

叶乙醇提取物对番茄早疫病菌、小麦赤霉和杨树溃疡病菌的抑制活性,要强于枝条提取物;但叶提

取物对玉米弯孢、黄瓜枯萎病菌、番茄枯萎病菌、棉花枯萎病菌、小麦纹枯病菌的抑制活性,要弱于枝条提取物。

## 2.2 枝条和叶萃取部分对真菌菌丝生长的抑制作用

由于乙醇粗提物对小麦赤霉、黄瓜枯萎病菌、棉花枯萎病菌菌丝生长具有较好的抑制作用,故选用上述三种真菌为供试菌,测定枝条和叶不同极性萃取部分对真菌菌丝生长的抑制作用,结果见表 2、3。

枝条乙醇提取物中,乙酸乙酯萃取部分抗菌活

性最强,且具有较好的量效关系,浓度为 2 mg/mL 时,对小麦赤霉、黄瓜枯萎病菌、棉花枯萎病菌菌丝生长的抑制率分别为 41.29%、29.10%和 29.93%。正丁醇萃取部分活性次之,水层部分活性最低。

叶提取物的不同极性萃取部分抗菌活性和枝条提取物萃取部分的活性类似,以乙酸乙酯部分活性最强,水部分活性最弱。浓度为 2 mg/mL 时,乙酸乙酯部分对小麦赤霉、黄瓜枯萎病菌、棉花枯萎病菌菌丝生长的抑制率分别为 44.72%、34.80%和 21.04%。

表 1 欧美 107 杨树枝条和叶乙醇提取物对真菌菌丝生长的抑制作用

Table 1 Inhibitory effects of the ethanol crude extracts of *Populus×euramericana* cl. '74/76' stems and leaves on mycelial growth of plant pathogenic fungi

供试真菌 Fungus	菌丝生长抑制率 Inhibitory rate of mycelial growth (%)		
	枝条乙醇提取物 Stem EtOH extract	叶乙醇提取物 Leaf EtOH extract	多菌灵 Carbendazim
番茄早疫病菌 <i>Alternaria solani</i>	36.23±4.51	56.41±1.22	22.75±1.38
玉米弯孢 <i>Curvularia lunata</i>	23.89±16.55	13.63±6.75	40.12±5.03
杨树溃疡病菌 <i>Dothiorella gregaria</i>	-16.55±14.16	35.13±4.38	92.24±1.08
小麦赤霉 <i>Fusarium graminearum</i>	35.67±4.04	46.74±1.52	100.00±0.00
黄瓜枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	31.82±1.86	26.24±0.84	100.00±0.00
番茄枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>Lycopersici</i>	33.81±5.68	15.08±3.46	97.87±0.53
棉花枯萎病菌 <i>F. vasinfectum</i>	35.03±2.07	23.40±0.73	100.00±0.00
小麦纹枯病菌 <i>Rhizoctonia cerealis</i>	31.39±0.96	10.71±0.00	92.22±0.96

注: 枝条提取物、叶提取物、多菌灵浓度分别为 2.2 和 10 μg/mL。

Note: Concentration of stem extract, leaf extract and carbendaim in medium were 2,2 mg/mL and 10 μg/mL respectively.

表 2 欧美 107 杨树枝条乙醇提取物和各萃取部分对真菌菌丝生长的抑制作用

Table 2 Inhibitory effects of the ethanol crude extract and its fractions of *Populus×euramericana* cl. '74/76' stems on mycelial growth of plant pathogenic fungi

处理 Treatment	浓度 Concentration (mg/mL)	菌丝生长抑制率 Inhibitory rate of mycelial growth (%)		
		小麦赤霉 <i>F. graminearum</i>	黄瓜枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	棉花枯萎病菌 <i>F. vasinfectum</i>
枝条乙醇粗提物 Stem EtOH crude extract	0.25	12.53±2.77	6.68±0.46	6.23±2.70
	1.00	32.23±13.52	10.85±0.46	15.51±1.43
	2.00	40.11±1.21	24.07±2.00	29.42±1.33
乙酸乙酯部分 EtOAc fraction	0.25	16.47±2.10	5.29±0.46	6.75±0.86
	1.00	36.56±2.89	13.23±0.92	21.69±1.55
	2.00	41.29±1.92	29.10±1.65	29.93±1.25
正丁醇部分 n- BuOH fraction	0.25	7.41±2.49	8.99±1.21	7.26±0.83
	1.00	24.35±4.65	11.11±0.79	6.49±1.56
	2.00	36.96±0.94	12.96±0.46	14.99±0.76
水部分 Aqueous fraction	0.25	4.26±1.78	1.00±0.79	8.55±2.73
	1.00	5.44±1.77	1.85±0.46	7.26±1.55
	2.00	6.62±1.77	2.12±0.46	3.40±1.59

注: 多菌灵在浓度为 10 μg/mL 时,对三种供试真菌菌丝生长的抑制率为 100%。

Note: Inhibitory rate of mycelial growth of carbendazim against three tested fungi was 100% at concentration of 10 μg/mL.

## 3 讨论

欧美 107 杨树是由中国林科院林业研究所选育出的新品种,具有耐旱性、耐寒性、生长迅速、抗病虫

危害、成材率高等优良性状,该树种已在东北、华北、西北大部分地区种植(张绮纹,1999;李善文等,2004;王枝梅,2004)。

多菌灵为广谱的抗真菌剂,在浓度为 10 μg/mL 时,对番茄早疫病菌的抑制活性较弱(表 1),推测本

研究选用的番茄早疫病菌菌株可能已对多菌灵产生了抗药性(或耐药性),由于杨树提取物对番茄早疫病菌具有较强的抑制活性,这为将来采用植物提取物防治抗药性菌株引起的病害提供了机会(Eksteen等,2001)。溃疡病菌是为害杨树茎干的一种病原真

菌,枝条乙醇粗提物对杨树溃疡病菌菌丝的生长有一定的促进作用,推测杨树溃疡病菌对宿主植物的抗菌活性成分具有某种解毒机制,这种情形在其它植物病原真菌中也存在(Glenn等,2001),具体机理值得深入研究。

表3 欧美107杨树叶乙醇提取物和各萃取部分对真菌菌丝生长的抑制作用  
Table 3 Inhibitory effects of the ethanol crude extract and its fractions of *Populus × euramericana* cl. '74/76' leaves on mycelial growth of plant pathogenic fungi

处理 Treatment	浓度 Concentration (mg/mL)	菌丝生长抑制率 Inhibitory rate of mycelial growth (%)		
		小麦赤霉 <i>F. graminearum</i>	黄瓜枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	棉花枯萎病菌 <i>F. vasinfectum</i>
叶乙醇粗提物 Leaf EtOH crude extract	0.25	14.57±3.34	1.08±0.89	8.27±0.87
	1.00	33.00±2.71	15.47±3.28	13.48±0.10
	2.00	41.79±2.53	23.56±0.71	18.20±0.52
乙酸乙酯部分 EtOAc fraction	0.25	21.27±3.00	8.50±0.98	4.49±0.79
	1.00	37.19±5.37	24.91±0.57	12.53±1.50
	2.00	44.72±3.09	34.80±2.14	21.04±1.52
正丁醇部分 n-BuOH fraction	0.25	9.55±0.67	7.60±0.87	1.65±0.81
	1.00	14.99±2.32	10.75±1.82	1.18±1.47
	2.00	20.02±2.34	16.82±0.54	1.42±0.01
水部分 Aqueous fraction	0.25	16.25±1.92	3.10±2.07	0.95±0.82
	1.00	17.09±0.64	3.10±1.35	1.42±1.22
	2.00	18.76±10.3	1.98±1.37	0.95±0.82

注:多菌灵在浓度为10 μg/mL时,对三种供真菌菌丝生长的抑制率为100%。

Note: Inhibitory rate of mycelial growth of carbendazim against three tested fungi was 100% at concentration of 10 μg/mL.

本研究的结果表明,欧美107杨树枝条和叶提取物具有较强的抗真菌活性,且活性成分主要集中在乙酸乙酯萃取部分,推测提取物中抗菌活性成分的极性为中等,这为进一步追踪分离杨树中抗菌活性成分提供了依据。

### 参考文献:

- 王战,方振富. 1984. 中国植物志(被子植物门,双子叶植物纲,杨柳科)(第20卷第2分册)[M]. 北京:科学出版社,7-81
- 周立刚. 2005. 植物抗菌化合物[M]. 北京:中国农业科学与技术出版社,74-83
- Cao XD(曹晓冬), Zhou LG(周立刚), Xie GH(谢光辉), et al. 2005. Integrated disease and pest control techniques of *Populus* spp. (杨树主要病虫害的防治技术)[J]. *Pract Fore Tech* (林业实用技术), (5): 24-26
- Eksteen D, Pretorius JC, Nieuwoudt TD, et al. 2001. Mycelial growth inhibition of plant pathogenic fungi by extracts of South African plant species[J]. *Ann Appl Biol*, 139(2): 243-249
- Glenn AE, Hinton DM, Yates IE, et al. 2001. Detoxification of corn antimicrobial compounds as the basis for isolating *Fusarium verticillioides* and some other *Fusarium* species from corn[J]. *Appl Environ Microbiol*, 67(7): 2973-2981
- Jian GZ(菅根柱). 2006. Prospects of integrative development and utilization on poplar resources(杨树综合开发利用前景)[J]. *China Fore Sci Tech* (林业科技开发), 20(3): 1-4
- Li D(李端), Zhou LG(周立刚), Jiang WB(姜微波), et al. 2005. Inhibitory effects of *Gleditsia sinensis* extracts on some plant

- pathogens(皂荚提取物对植物病原菌的抑制作用)[J]. *Acta Phytopathol Sin* (植物病理学报), 35(S): 86-90
- Li D(李端), Zhou LG(周立刚), Wang JG(王敬国), et al. 2006. Inhibitory effects of *Sophora alopecuroides* extract to pathogens on cucumber and tomato(苦豆子提取物对黄瓜和番茄病原菌的抑制作用)[J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin* (西北植物学报), 26(3): 558-563
- Li SW(李善文), Zhang ZY(张志毅), He CZ(何承忠), et al. 2004. Progress on hybridization breeding of poplar in China(中国杨树杂交育种研究进展)[J]. *World Fore Res* (世界林业研究), 17(2): 37-41
- Quiroga EN, Sampietro R, Vattuone MA. 2001. Screening antifungal activities of selected medicinal plants[J]. *J Ethnopharmacol*, 74(1): 89-96
- Wang ZM(王枝梅). 2004. New clones 107 and 108 of *Populus × euramericana*(杨树新品种-欧美杨107号、108号)[J]. *Mod Agric* (现代农业), (8): 12
- Zhang AL(张鞍灵), Gao JM(高锦明), Li XX(李秀信). 1998. Poplar resources that should be developed and utilized(杨树资源亟待开发利用)[J]. *Shaanxi Fore Sci Tech* (陕西林业科技), (2): 24-26
- Zhang YW(张绮纹). 1999. Novel clone 107 of *Populus × euramericana* in paper making and ecology protection(杨树优良纸浆材和生态防护林新品种欧美杨107号)[J]. *Fore Res* (林业科学研究), 12(3): 332
- Zhou LG(周立刚), Song WT(宋卫堂), Xie GH(谢光辉), et al. 2004. Antimicrobial treatment of nutrient solution in hydroponic cultivation of *Populus nigra*(黑杨水培中营养液抑菌处理研究)[J]. *Guihaia* (广西植物), 24(3): 259-262