

国颖,周玉慧,王鹏,等. 柠檬醛及其衍生物对油茶炭疽病菌的抑菌活性[J]. 江苏农业科学,2016,44(12):167-171.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.12.049

柠檬醛及其衍生物对油茶炭疽病菌的抑菌活性

国颖¹,周玉慧²,王鹏¹,陈尚钊¹,范国荣¹,王宗德¹

(1. 江西农业大学林学院/国家林业局江西省樟树工程技术研究中心/江西农业大学江西特色林木资源培育与利用 2011 协同创新中心,江西南昌 330045; 2. 江西庐山国家级自然保护区管理局,江西庐山 332900)

摘要:采用菌丝生长速率法研究天然柠檬醛及其衍生物共 10 种化合物对油茶炭疽病菌生长的影响,并与广谱抗菌农药抑菌作用进行对比。结果表明,天然柠檬醛及其衍生物对油茶炭疽病菌均有一定的抑制作用,且抑制效果随浓度升高而增强。橙花素、柠檬腈和柠檬醛 1,2-丙二醇缩醛的抑制中浓度 EC_{50} 分别为 12.28、14.09、42.78 mg/L。所选的 4 种广谱农药多菌灵、百菌清、甲基硫菌灵、代森锰锌的抑制中浓度 EC_{50} 分别为 4.37、29.86、37.98、14.62 mg/L。通过比较分析,柠檬腈、橙花素和柠檬醛 1,2-丙二醇缩醛对油茶炭疽病菌的抑制效果优于或类似于广谱抗菌农药,具有较高的开发价值。

关键词:天然柠檬醛;衍生物;油茶炭疽病菌;抑菌活性

中图分类号: S435.659 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)12-0167-04

油茶是我国特有的木本油料植物,其种子能够压榨出上等食用油,茶油素有“东方橄榄油”“液体黄金”的美誉,具有较高的经济价值。近年来,油茶炭疽病发病频率高、危害严重,各地常年因炭疽病减产 10%~30%,重病减产 50% 以上。目前油茶炭疽病害以化学药剂防治为主^[1],但病菌易对化学杀菌剂产生抗药性,从而逐渐降低抑菌效果,长期使用会对环境造成严重危害。同时,化学药剂的使用会导致绿色食品——茶油农药残留超标。从高效环保角度出发,天然源抗菌剂已成为新农药的研发趋势^[2-3]。

山鸡椒 [*Litsea cubeba* (Lour.) Pers.] 别称山苍子,是樟科木姜子属的落叶小乔木或灌木,从其果实、叶子等组织中提取分离出的化学成分就是山苍子油,广泛用于香精香料的生产。大量研究表明,山苍子油及其主要成分柠檬醛具有较强的抑菌作用^[4]。方德秋等综述中提到,早在 1945 年国外科学家就对柠檬醛抗菌功能进行了报道,研究发现,柠檬醛对细菌也有抑制作用^[5]。同时,山苍子油及柠檬醛可直接用于消除黄曲霉,并对一些成虫有一定的熏蒸作用^[6]。因此,山苍子油及柠檬醛在抑菌方面具有很高的开发价值^[7-8]。

山苍子油主成分及其衍生物对真菌、细菌等病原菌的研究较多^[9-10],而对其在油茶等经济树种病害防治方面的研究较少。本研究开展了山苍子油主成分柠檬醛及其 9 种衍生物对油茶炭疽病原菌抑制作用的研究,并与广谱抗菌农药抑菌作用进行对比分析,为筛选出高效的植物源杀菌剂提供依据。

收稿日期:2015-10-22

基金项目:国家自然科学基金(编号:31360163);中央财政林业科技推广示范资金[编号:JXTG(2014)-10];江西省林业科技创新专项(编号:201502);大学生创新创业训练计划(编号:DC201309)。
作者简介:国颖(1991—),女,黑龙江鹤岗人,硕士研究生,主要从事植物资源利用研究。E-mail:497147883@qq.com。

通信作者:陈尚钊,副教授,硕士生导师,主要从事植物资源利用与活性研究。Tel:(0791)83813243;E-mail:csxjng@126.com。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌种及来源 油茶炭疽病菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*),由江西农业大学农学院植物病理学实验室提供。把保存在试管中的菌种接入含有 PDA 培养基的培养皿中,在 25℃ 下培养 2~3 d,以备接种使用。

1.1.2 供试样品及来源 天然柠檬醛、柠檬醛 1,2-丙二醇缩醛、柠檬醛乙二醇缩醛、紫罗兰酮、 β -紫罗兰酮、甲基紫罗兰酮、异甲基紫罗兰酮、鸢尾酮、橙花素、柠檬腈由江西农业大学植物天然产物与林产化工研究所利用天然柠檬醛为原料,经结构修饰改造得到,以上样品 GC 纯度均为 95% 以上。其他化学药品从市场上购买,均为分析纯。

1.1.3 仪器与设备 LDZX-50KBS 立式压力蒸汽灭菌锅(上海申安医疗器械厂);SW-CJ-ID 型无菌超净工作台(苏州净化设备有限公司);GHP-250 型智能培养箱(上海三发科学仪器有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 化合物抑菌活性测定 对植物病原菌菌丝生长的抑制作用采用生长速率法^[11]测定。培养基的制备:在无菌条件下,将配制好浓度的化合物(用不超过总体积 2% 的吐温将化合物充分溶于无菌水中)与灭菌好的马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)混合均匀,倒入已灭菌处理的培养皿中,配制成终浓度为 800.00、160.00、32.00、6.40、1.28 mg/L 的化合物,农药的浓度根据使用剂量说明配制。取已经活化与培养好的病原菌菌饼(直径 5 mm),接种到上述培养基,每个培养皿接种 1 个菌饼,每个浓度重复 3 次。以未添加化合物的 PDA 平板作为试验对照。当试验对照的平板菌落直径长到培养皿的 70% 以上时,用直尺以十字交叉法测量直径,取平均值。采用下列公式计算抑制率:

菌落直径 = 菌落平均直径 - 菌饼直径(5 mm)。

菌丝生长抑菌率 = [(对照菌落生长量 - 处理菌落生长

量)/对照生长量]×100%。

1.2.2 数据分析 试验数据为 3 组重复试验的平均值,采用 Microsoft Excel 2007 软件和 DSP 7.05 专业版进行数据统计分析。

1.2.3 抑制中浓度计算 根据天然柠檬醛及其衍生物药剂处理对油茶炭疽病菌菌落的生长抑制结果,分别进行一元回归统计分析,以浓度的对数值为 x ,以抑菌率为 y ,分别得出各自的毒力回归方程,并求出 EC_{50} 和各自的相关系数。

2 结果与分析

2.1 柠檬醛及其衍生物对油茶炭疽病原菌的抑制作用

2.1.1 抑菌效果分析 从表 1 可知,天然柠檬醛及其衍生物对油茶炭疽病原菌均有一定的抑制效果,当浓度在 800 mg/L 时,橙花素、柠檬腈和柠檬醛 1,2-丙二醇缩醛的抑菌率均达

到 100.00%,天然柠檬醛的抑菌率为 88.19%,而柠檬醛乙二醇缩醛和鸢尾酮的抑菌率最低,分别只有 37.09%和 42.59%。随着化合物浓度的降低,对油茶炭疽病的抑制作用也随之逐渐降低,但不同的化合物其抑菌率随浓度降低的速率各不相同。浓度对柠檬醛 1,2-丙二醇缩醛、 β -紫罗兰酮的抑菌率影响较为明显,当浓度为 800.00 mg/L 时,柠檬醛 1,2-丙二醇缩醛的抑菌率为 100.00%, β -紫罗兰酮的抑菌率为 74.81%;而当浓度为 160.00 mg/L 时,柠檬醛 1,2-丙二醇缩醛的抑菌率只有 17.50%, β -紫罗兰酮的抑菌率为 24.44%。浓度在 800.00 mg/L 与 160.00 mg/L 之间,抑菌率分别相差 82.50 百分点和 50.37 百分点。但对鸢尾酮和紫罗兰酮的抑菌率影响不是很显著,浓度 800.00 mg/L 和 160.00 mg/L 之间,鸢尾酮的抑菌率相差 9.26 百分点,紫罗兰酮的抑菌率相差只有 13.73 百分点。

表 1 天然柠檬醛及其衍生物对油茶炭疽病菌生长抑制效果

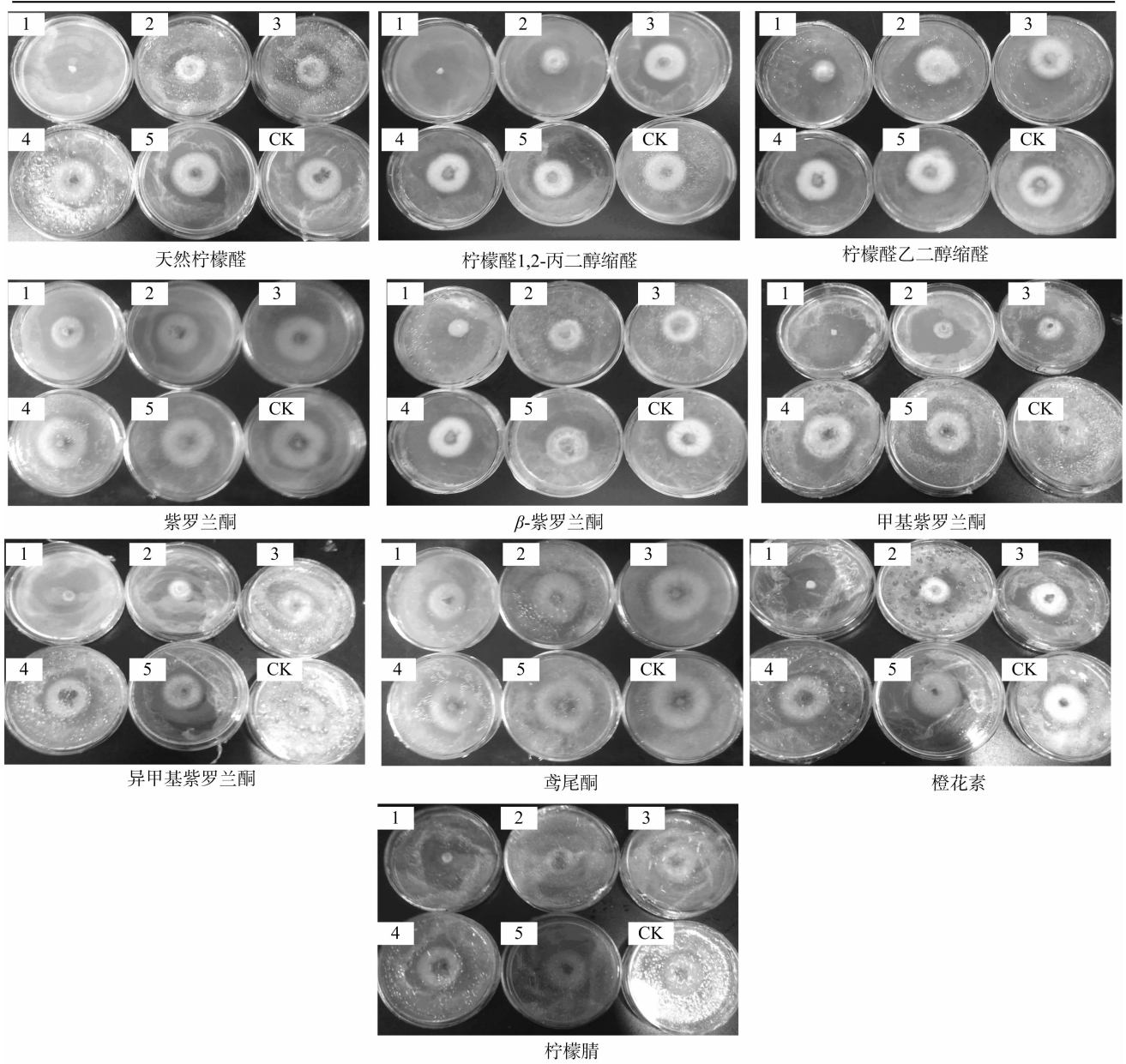
化合物种类	浓度 (mg/L)	菌落直径 (cm)	抑菌率 (%)	化合物种类	浓度 (mg/L)	菌落直径 (cm)	抑菌率 (%)
天然柠檬醛	800.00	0.50	88.19	甲基紫罗兰酮	800.00	1.67	62.12
	160.00	2.70	36.22		160.00	2.57	41.67
	32.00	3.70	12.60		32.00	3.30	25.00
	6.40	4.00	5.51		6.40	3.77	14.39
	1.28	4.07	3.40		1.28	4.00	9.09
	CK	4.23	0.00		CK	4.40	0.00
柠檬醛 1,2-丙二醇缩醛	800.00	0.00	100.00	异甲基紫罗兰酮	800.00	0.97	76.98
	160.00	3.30	17.50		160.00	2.00	52.38
	32.00	3.73	6.67		32.00	3.17	24.60
	6.40	3.87	3.33		6.40	3.60	14.29
	1.28	3.90	2.50		1.28	3.90	7.14
	CK	4.00	0.00		CK	4.20	0.00
柠檬醛乙二醇缩醛	800.00	2.85	37.09	鸢尾酮	800.00	3.10	42.59
	160.00	3.77	16.85		160.00	3.60	33.33
	32.00	4.17	8.02		32.00	3.97	26.54
	6.40	4.30	5.08		6.40	4.63	14.20
	1.28	4.43	2.13		1.28	5.03	6.79
	CK	4.50	0.00		CK	5.40	0.00
紫罗兰酮	800.00	0.97	76.98	橙花素	800.00	0.00	100.00
	160.00	2.00	52.38		160.00	0.43	88.10
	32.00	3.17	24.60		32.00	1.70	60.32
	6.40	3.60	14.29		6.40	3.33	19.84
	1.28	3.90	7.14		1.28	4.00	6.35
	CK	4.20	0.00		CK	4.20	0.00
β -紫罗兰酮	800.00	1.13	74.81	柠檬腈	800.00	0.00	100.00
	160.00	3.40	24.44		160.00	0.53	88.10
	32.00	3.70	17.78		32.00	1.90	56.25
	6.40	4.00	11.11		6.40	2.90	30.16
	1.28	4.10	8.89		1.28	3.87	7.14
	CK	4.50	0.00		CK	4.20	0.00

注:CK 为对照,浓度 =0 mg/L。

从图 1 可以看出,这 10 种化合物对油茶炭疽病菌都有一定的抑制作用,随着浓度的增高,抑制作用逐渐增强,而不同的化合物抑制作用并不相同。

2.1.2 毒力回归方程建立 从表 2 可以看出,天然柠檬醛及其 9 种衍生物对油茶炭疽病菌的毒力大小依次是:柠檬腈、橙花素、柠檬醛 1,2-丙二醇缩醛、异甲基紫罗兰酮、天然柠檬

醛、甲基紫罗兰酮、 β -紫罗兰酮、鸢尾酮、柠檬醛乙二醇缩醛、紫罗兰酮。其中橙花素和柠檬腈的毒力最接近, EC_{50} 分别是 14.09、12.28 mg/L,柠檬醛 1,2-丙二醇缩醛的 EC_{50} 值是 42.78 mg/L。异甲基紫罗兰酮和天然柠檬醛最接近,分别是 132.27、149.91 mg/L。柠檬腈、橙花素和柠檬醛 1,2-丙二醇缩醛对油茶炭疽病菌的毒力较强,抑菌效果较好,而鸢尾



1—800.00 mg/L; 2—160.00 mg/L; 3—32.00 mg/L; 4—6.40 mg/L; 5—1.28 mg/L; CK—0.00 mg/L
图1 10 种化合物对油茶炭疽病菌的抑制作用

酮、柠檬醛乙二醇缩醛、紫罗兰酮对油茶炭疽病菌的抑制中浓度较大,说明它们对油茶炭疽病菌的抑制效果不明显。

2.2 4 种农药对油茶炭疽病菌的抑菌作用

2.2.1 抑菌效果分析 由表 3 可知,这 4 种农药对油茶炭疽病菌均有一定的抑制效果。农药浓度的选择以每种农药使用时的有效浓度为依据。当所选 4 种农药的有效浓度最高时,

表 2 10 种化合物对油茶炭疽病原菌的毒力回归方程

化合物	毒力回归方程	抑制中浓度 EC ₅₀ (mg/L)	相关系数 <i>r</i>
天然柠檬醛	$y = 1.0846x + 2.6582$	149.91	0.9298
柠檬醛 1,2-丙二醇缩醛	$y = 2.1207x + 1.5732$	42.78	0.7952
柠檬醛乙二醇缩醛	$y = 0.5892x + 2.8358$	5104.61	0.9871
紫罗兰酮	$y = 0.5090x + 3.0869$	6084.66	0.9992
β-紫罗兰酮	$y = 0.6505x + 3.3208$	388.31	0.8925
甲基紫罗兰酮	$y = 0.5909x + 3.5178$	342.23	0.9941
异甲基紫罗兰酮	$y = 0.7988x + 3.3102$	132.27	0.9868
鸢尾酮	$y = 0.4632x + 3.5440$	1516.48	0.9855
橙花素	$y = 2.1192x + 2.5798$	14.09	0.9195
柠檬醛	$y = 2.0931x + 2.7205$	12.28	0.9245

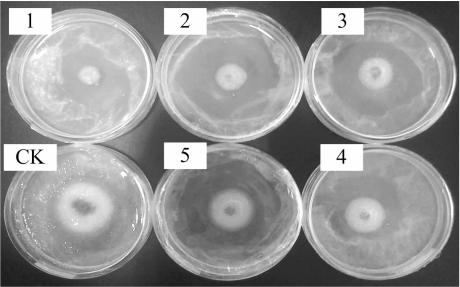
抑菌效果是多菌灵(100.00%) > 百菌清(93.50%) > 甲基硫菌灵(78.05%) > 代森锰锌(65.87%),当有效浓度次高时,多菌灵的抑菌效果最好(95.94%),代森锰锌的抑菌效果最差(52.38%)。随着农药有效浓度的降低,它们的抑菌效果也在不断降低,代森锰锌和多菌灵随着有效浓度的降低呈逐渐降低的趋势,降低幅度不是很大,百菌清的抑菌率随有效浓度变化比较明显,当有效浓度最高时为 93.50%,当有效浓度减半时抑菌率为 65.04%,而甲基硫菌灵当有效浓度为 50.00 mg/L 时,抑菌率为 71.54%,当有效浓度为 25.00 mg/L 时抑菌率为 27.64%,抑菌率下降了 43.90 百分点。

表 3 4 种农药对油茶炭疽病菌生长抑制效果

化合物种类	浓度 (mg/L)	菌落直径 (cm)	抑菌率 (%)
代森锰锌	40.00	1.43	65.87
	20.00	2.00	52.38
	10.00	2.33	44.44
	5.00	2.63	37.30
	2.50	3.15	25.00
	CK	4.20	0.00
百菌清	100.00	0.26	93.50
	50.00	1.43	65.04
	25.00	2.85	30.49
	12.50	3.20	21.95
	6.25	3.70	9.76
	CK	4.10	0.00
甲基硫菌灵	100.00	0.90	78.05
	50.00	1.17	71.54
	25.00	2.97	27.64
	12.50	3.45	15.85
	6.25	3.83	6.50
	CK	4.10	0.00
多菌灵	50.00	0.00	100.00
	25.00	0.17	95.94
	12.50	0.97	76.42
	6.25	1.30	68.29
	3.125	1.55	62.20
	CK	4.10	0.00

注:CK 为对照,浓度(mg/L) = 0。

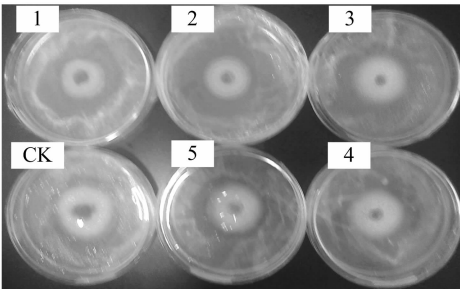
从图 2 至图 5 可以看出,随着浓度的增加,这 4 种化合物对油茶炭疽病菌抑制作用逐渐增强,且不同的化合物抑制作用不相同。当浓度较低时,代森锰锌和多菌灵对油茶炭疽病菌抑制作用也较强。



1—40.0 mg/L; 2—20.0 mg/L; 3—10.0 mg/L; 4—5.0 mg/L; 5—2.5 mg/L; CK—0.0 mg/L

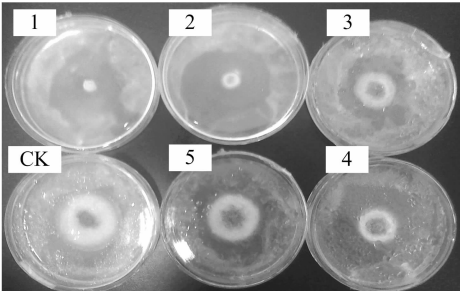
图2 代森锰锌对油茶炭疽病菌的抑制作用

2.2.2 毒力回归方程建立 由表 4 可知,4 种农药对油茶炭疽病菌的毒力大小依次是多菌灵、代森锰锌、百菌清、甲基硫菌灵,其中多菌灵的抑制中浓度 EC₅₀ 为 4.37 mg/L,而甲基硫



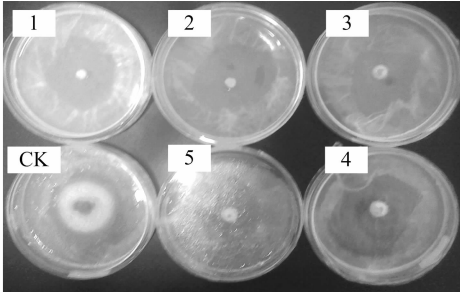
1—100.00 mg/L; 2—50.00 mg/L; 3—25.00 mg/L; 4—12.50 mg/L; 5—6.25 mg/L; CK—0.00 mg/L

图3 甲基硫菌灵对油茶炭疽病菌的抑制作用



1—100.00 mg/L; 2—50.00 mg/L; 3—25.00 mg/L; 4—12.50 mg/L; 5—6.25 mg/L; CK—0.00 mg/L

图4 百菌清对油茶炭疽病菌的抑制作用



1—50.000 mg/L; 2—25.000 mg/L; 3—12.500 mg/L; 4—6.250 mg/L; 5—3.125 mg/L; CK—0.000 mg/L

图5 多菌灵对油茶炭疽病菌的抑制作用

菌灵的抑制中浓度 EC₅₀ 为 37.98 mg/L。这 4 种农药对油茶炭疽病菌均有一定的抑制效果,且抑制效果都较好。

通过比较天然柠檬醛及其 9 种衍生物与农药对油茶炭疽病菌活性的抑制效果分析可以看出,橙花素、柠檬腈和柠檬醛 1,2-丙二醇缩醛的抑制中浓度与 4 种农药相当,说明它们与所选择的 4 种农药具有相近的抑菌效果。

表 4 4 种农药对油茶炭疽病原菌的毒力回归方程

农药	毒力回归方程	抑制中浓度 EC ₅₀ (mg/L)	相关系数 r
代森锰锌	y = 0.840 0x + 4.028 4	14.62	0.990 5
百菌清	y = 2.199 7x + 1.786 1	29.86	0.965 3
甲基硫菌灵	y = 2.040 9x + 1.790 5	37.98	0.984 3
多菌灵	y = 3.585 7x + 2.701 9	4.37	0.867 8

3 结论

研究结果表明,天然柠檬醛及其 9 种衍生物与 4 种广谱农药一样对油茶炭疽病菌均有一定的抑制效果。供试化合物作为药剂浓度越高时,抑菌效果越好。天然柠檬醛及其 9 种

刘贵友,邹 瑶,顾杨霞,等. 内生真菌对连作花生土壤尖孢镰刀菌的拮抗作用[J]. 江苏农业科学,2016,44(12):170-174.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.12.050

内生真菌对连作花生土壤尖孢镰刀菌的拮抗作用

刘贵友^{1,2}, 邹 瑶¹, 顾杨霞¹, 戴传超²

(1. 江苏第二师范学院生命科学与化学化工学院, 江苏南京 210013;

2. 南京师范大学生命科学学院/江苏省微生物资源产业化工程技术研究中心/江苏省微生物与功能基因组学重点实验室, 江苏南京 210023)

摘要:在实验室条件下研究 3 种内生真菌对连作花生土壤尖孢镰刀菌的拮抗作用。结果表明:拟茎点霉 NJ4.1 菌株、拟茎点霉 B3 菌株和角担子菌 B6 菌株对花生根腐病原菌尖孢镰刀菌均有拮抗作用,其中拟茎点霉 NJ4.1 菌株对尖孢镰刀菌抑制作用明显,抑菌率为 38.93%,与尖孢镰刀菌生态位重叠指数为 1/3;拟茎点霉 NJ4.1 菌株生长过程中产生的挥发物对尖孢镰刀菌抑菌率为 18.15%,拟茎点霉 NJ4.1 菌株发酵液对尖孢镰刀菌也有一定的抑制作用,但明显小于挥发物对尖孢镰刀菌的影响。

关键词:内生真菌;花生根腐病;尖孢镰刀菌;拮抗作用;生态位重叠指数

中图分类号: S435.652 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)12-0171-04

花生是世界上分布较广泛的作物,世界六大洲都有种植。花生是我国重要的油料、经济作物,2013 年我国花生种植面积 463 万 hm^2 ,花生总产量 1 697 万 t,因此可见,我国是世界上花生总产量和花生油总产量最大的国家^[1]。近年来,我国大豆产业受到国外冲击,花生行业的稳定及可持续发展对食

用油安全有着重要意义。因土地资源有限,产区相对集中,很多地方已经形成传统的优势花生种植产业,农民常常连片、大规模种植,有的甚至已连作 10~20 年,往往导致花生根腐病、白绢病等真菌病害加剧^[2],荚果产量下降,生产成本增加^[3]。

花生根腐病俗称“鼠尾”、烂根,它是由包括尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)在内的镰刀菌属引起的。最新研究表明,随着花生连续种植,尖孢镰刀菌的相对丰度显著增加,连作花生根腐病发病率提高 2 倍^[4],是限制连作花生生产的关键因素。病原真菌侵染不仅引起花生减产,而且还会影响花生品质^[5]。目前,克服病原真菌引起花生减产、质量下降的方法主要是使用大量有机肥和药剂等,这不仅增加生产成本,还会引起环境污染,危害人体健康等。生物防治是一种对环境友好、对病害具有潜在

收稿日期:2015-10-27

基金项目:国家自然科学基金(编号:31370507);江苏省教育厅产业化推进项目(编号:JHB2012-16)。

作者简介:刘贵友(1973—),男,江苏南京人,博士,副教授,研究方向为微生物转化和微生物生态学。E-mail: liuguiyou2001@163.com。

通信作者:戴传超,博士,教授,研究方向为微生物生态学和土壤生态与修复。E-mail: daichuanhao@njnu.edu.cn。

衍生物中橙花素、柠檬腈和柠檬醛 1,2-丙二醇缩醛的抑菌率最好,在浓度 800.00 mg/L 时均达到 100.00%,它们的抑菌效果依次为柠檬腈>橙花素>柠檬醛 1,2-丙二醇缩醛,抑菌中浓度分别为 12.28、14.09、42.78 mg/L。

4 种农药的抑菌效果也有所不同,农药有效浓度最高时,抑菌效果顺序是多菌灵>百菌清>甲基硫菌灵>代森锰锌,当有效浓度稍降低时,多菌灵的抑菌效果最好,代森锰锌的抑菌效果最差。多菌灵、代森锰锌、百菌清、甲基硫菌灵 4 种农药的抑菌中浓度分别为 4.37、14.62、29.86、37.98 mg/L。

天然柠檬醛及其 9 种衍生物与 4 种广谱农药相比,柠檬腈、橙花素和柠檬醛 1,2-丙二醇缩醛的抑菌效果与 4 种广谱农药相近,是值得开发用于抑制油茶炭疽病菌的化合物。

参考文献:

- [1] 胡林峰,韩会娟,侯建虎. 六种植物的提取物抑菌活性研究[J]. 湖北农业科学,2011,50(14):2880-2881.
- [2] Randrianarivelo R, Sarter S, Odoux E, et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Cinnamosma fragrans*[J]. Food Chemistry, 2009, 114(2):680-684.

- [3] 陈兆森. 山苍子资源的综合利用[J]. 林化科技通讯,1987(1):16-20.
- [4] 周玉慧,甘仙女,陈尚钊,等. 山苍子油及柠檬醛提取分离与生物活性研究进展[J]. 生物灾害科学,2013,36(2):148-153.
- [5] 方德秋,肖顺元. 柠檬醛及香精油的抗菌性研究概述[J]. 天然产物研究与开发,1994,6(2):75-78.
- [6] 余伯良. 山苍子油对霉菌抗菌性及其与黄曲霉产毒关系的研究[J]. 微生物学通报,1988,25(3):144-147.
- [7] 江建国,陈京元,蔡三三,等. 10 种杀菌剂对大叶黄杨坏损尾孢菌的毒力测定及应用分析[J]. 湖北生态工程职业技术学院学报,2008,6(4):1-3.
- [8] Saddiq A A, Khayyat S A. Chemical and antimicrobial studies of monoterpene: citral [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2010, 98(1):89-93.
- [9] 周 勇,陶君娣,张家俊. 山苍子挥发油及其主要成分柠檬醛的抗真菌作用的研究[J]. 中西医结合杂志,1984,4(9):558-559.
- [10] 周玉慧,陈尚钊,范国荣,等. 柠檬醛衍生物对植物病原菌的抑制活性[J]. 江苏农业科学,2014,42(3):81-83.
- [11] 慕立义. 植物化学保护研究方法[M]. 北京:中国农业出版社,1944.