

黑松针叶提取物抗霉菌活性的研究

孙红英, 卢雪梅, 李 娟, 韩晓弟

(山东大学威海分校 海洋学院 山东 威海 264209)

摘 要: 采用滤纸片法, 检测不同质量浓度的针叶提取物对霉菌的抑制圈大小, 以研究黑松针叶提取物的抗霉菌活性。结果表明: 黑松针叶提取物具有抗霉菌活性, 但抑制效果与其质量浓度不成正比; 3种提取物中, 乙醇提取物的抗霉菌效果最显著, 丙酮和水提取物的抗霉菌效果次之。其对黑曲霉、青霉、根霉起最佳抑制效果的质量浓度分别为 6.25、25.0、12.5 g/L, 其抑菌圈直径分别为 14.8、16.6、12.6 mm。

关键词: 黑松; 提取物; 抗霉菌活性; 抑菌圈

中图分类号: Q 946.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)08-0054-04

近几十年来, 化学农药一直处于快速发展的时期^[1]。目前, 化学农药的种类已增加到 1 300 余种, 全世界化学农药年产量大约在 300~400 万 t^[2]。化学农药广泛应用于农业、林业、果蔬及渔业等领域, 但由于其具有化学性质稳定、残留期长、不易分解等特点, 一旦造成污染, 便很难消除^[3-4], 化学农药的广泛使用必然带来很大的负面影响^[5]; 同时化学农药会杀死天敌, 影响生态平衡, 导致环境自控力下降^[6]; 更让人们担忧的是化学农药可通过生物富集和食物链进入人体和其它生物

体, 最终影响人体健康^[7]。仅 1999 年全国农村农药中毒报告 18 570 例, 死亡 1 311 例, 病死率 7.06%^[8]。

植物是生物活性化合物的天然宝库, 其产生的次生代谢产物超过 403 种^[9]。其中的大多数次生代谢产物如萜烯类、生物碱、类黄酮、甾体类、独特的氨基酸和糖等均具有杀虫或抗菌活性, 因此植物可以作为天然绿色杀虫抑菌剂的重要资源。以植物为主要原料获取的“植物源农药”因其效率高、毒性低、残留时间短、且符合现代环保意识及人们的健康要求, 而越来越引起世界各国的高度重视^[10]。

迄今为止, 有关植物源杀菌剂方面的研究资料基本空白^[11-13], 而黑松的抗霉菌活性方面的研究更是无人涉足。鉴于此, 该研究力求通过黑松针叶不同提取物的抗霉菌活性的研究, 为开发具有明显杀菌作用的植物源农药提供基础资料, 为植物源农药逐步代替化学农药提供依据, 同时为黑松的药理药化方面的研究提供参考。

第一作者简介: 孙红英(1986-), 女, 本科, 研究方向为植物生物的研究。

通讯作者: 韩晓弟(1963-), 男, 山东莱州市人, 副教授, 理学硕士, 研究方向为植物学。E-mail: hanxiaodi@shou.edu.cn。

收稿日期: 2009-02-20

Evaluation of Resistance to *Plasmopara viticola* and Study on Leaf Biochemical Indexes in Zizhenxiang Grapevine Variety Selfing Progenies

GUO Xiu-wu, ZHANG Na FENG Zhe

(College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161, China)

Abstract: During the major onset of *Plasmopara viticola*, the resistance of six strains tested from Zizhenxiang grape variety self progenies to *Plasmopara viticola* was studied by means of natural infection investigation in field and determining the PPO and PAL activities in leaves before infection and after infection. The results showed that there was positive correlation between the resistance of grapevines tested and activities of PPO and PAL. The resistance of strains tested existed significantly different. The resistance of 08-88 was the strongest. It improved markedly comparing with the parent strain. The resistance of 08-42, 08-51 was intermediate to *Plasmopara viticola*. The resistance of 08-141, 08-96, 08-13 was the weakest and far beneath the parent strain Zizhenxiang.

Key words: Zizhenxiang grapevine; Self progenies; *Plasmopara viticola*; Resistance evaluation; PPO; PAL

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 黑松(*Pinus thunbergii*)针叶采于山东大学威海分校校园,样品由通讯作者韩晓弟副教授鉴定,凭证标本保存在山东大学威海分校海洋学院标本室。

1.1.2 供试菌种及培养基 该试验采用的霉菌:青霉(*Penicillium chrysogenum*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、根霉(*Rhizopus nigricans*)由山东大学威海分校微生物学实验室提供,邢翔老师鉴定。霉菌培养选用马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)。

1.1.3 试验仪器 多功能搅拌器(HJ-5,常州国华电器有限公司);恒温水浴锅(北京市长风仪器仪表公司);旋转蒸发仪(RE-3000型,上海亚荣生化仪器厂);超净工作台;立式自动电热压力蒸汽灭菌(LDZX40AI型,北京市长风仪器仪表公司);180G 冰箱;生化培养箱(LRH-250A);DJ 灵巧型粉碎机。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种活化 将所有供试的菌种移接入相应的试管斜面培养基上,各种霉菌移接数支,置于28℃培养箱培养48 h,取出置于0~4℃冰箱冷藏备用。

1.2.2 提取物的制备 黑松针叶水提取物的制备方法^[11-12]如下:新鲜黑松松叶100.0 g,置入广口瓶,瓶中加入蒸馏水2 000 mL,浸泡24 h后过滤,收集滤液;滤渣中加入蒸馏水1 700 mL,浸泡24 h后过滤,合并2次滤液。旋转蒸发仪浓缩蒸馏,得浸膏状水提取物13.10 g。黑松针叶丙酮和乙醇提取物的制备按黑松针叶水提取物的制备方法。

1.2.3 供试材料灭菌 无菌水、滤纸片和培养基均采用常规湿热灭菌法;玻璃用品采用干热灭菌法。

1.2.4 菌种培养 将活化的3株霉菌菌种接种在已灭菌的试管斜面培养基上,每种霉菌接3支试管,接种后置于28℃培养箱培养。

1.2.5 菌悬液制备 把预先活化的菌种制成菌悬液,菌悬液中的霉菌为处于旺盛生长期的营养菌丝。

1.2.6 浸泡滤纸片 将黑松松叶的不同溶剂提取物用二倍稀释法分别稀释成100.0、50.0、25.0、12.5、6.3、3.1、1.6、0.8 g/L等16个质量浓度,已灭菌的滤纸片在各溶剂中浸泡24 h,供抑菌试验用。用无菌水浸泡的滤纸片作对照。

1.2.7 抑菌试验方法 琼脂扩散滤纸片法测定抑菌圈直径大小^[14]。在无菌条件下,将冷却至45℃的培养基快速倒平板,每皿需培养基量为10~15 mL。在无菌条件下,接不同的菌种,用灭过菌的移液管吸取0.1 mL菌悬液注入相应的培养皿中,用无菌玻璃推棒推匀。用无菌镊子夹取浸泡在药剂中的滤纸片,滤去多余的汁液放

入培养皿中,每皿放3片,呈正三角形放置。将以上培养皿放入培养箱中28℃培养72 h,测量抑菌圈大小。

1.3 最低抑菌质量浓度测定

按照抑菌实验方法操作,取出观察结果,以24 h无霉菌生长的提取液质量浓度为最低抑菌质量浓度。

2 结果与讨论

2.1 黑松针叶不同提取物对霉菌的抑菌效果

2.1.1 黑松水提取物对霉菌的抑菌效果 图1表明,黑松针叶水提取物对3种霉菌均有明显的抑制作用,抑菌效果与质量浓度有关,其最佳抑菌质量浓度因霉菌种类不同而有差异。黑曲霉在3.10 g/L时,抑菌效果最明显,抑菌圈直径为13.8 mm。青霉在100.0 g/L时,抑菌效果最显著,抑菌圈直径为15.6 mm。根霉在6.25 g/L时,抑菌效果最明显,抑菌圈直径为11.5 mm。同时,可明显看出,黑松水提取物对青霉的抑菌作用与处理的浓度成正比,而提取物对黑曲霉、根霉的抑菌效果为:随着提取物浓度的升高,其抑菌效果逐渐增强,直至最佳抑菌质量浓度,但之后随着提取物浓度升高,其抑菌效果反而减弱。整体来讲,黑松提取物对3种霉菌的抑制作用中,对青霉的抑制效果最为明显,黑曲霉次之,根霉最弱。上述黑松水提取物抑菌效果上的差异,说明不同霉菌菌株对植物源抑菌物质的反应存在着种间上的差异,具体机理有待于进一步研究探讨。

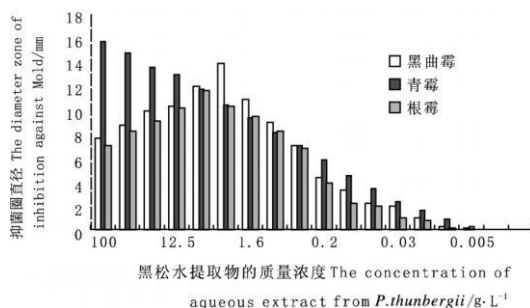


图1 黑松水提取物对3种霉菌的抑制效果

Fig. 1 Antifungal activity of aqueous extracts of *P. thunbergii* needles

2.1.2 黑松丙酮提取物对霉菌的抑菌效果 由图2看出,黑松针叶丙酮提取物对3种霉菌的抑制作用明显,抑菌效果与质量浓度基本成正比关系;其最佳抑菌质量浓度与霉菌菌株有关。其中,黑曲霉在25.0 g/L时,抑菌效果最显著,抑菌圈直径为14.3 mm;青霉在100.0 g/L时,抑菌效果最明显,抑菌圈直径为16.1 mm;根霉在50.0 g/L时,抑菌效果最明显,抑菌圈直径为12.1 mm。不同植物相同成分或同一植物不同成分的提取应采用不同方法。丙酮对病原菌的毒性较低、极性中等、可兼顾水溶性和脂溶性成分^[13]。与水提取物对霉菌的抑制结果比较,丙酮提取物中由于兼顾水溶性和脂溶性

的抑菌成分,能提取出水提取物所不能提取的生物活性抑菌物质,可能是形成丙酮提取物抑菌效果与质量浓度基本成正比关系的原因。

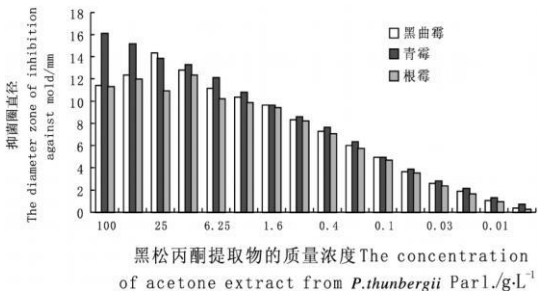


图2 黑松丙酮提取物对3种霉菌的抑制效果
Fig.2 Antifungal activity of acetone extracts of *P. thunbergii* needles

2.1.3 黑松乙醇提取物对霉菌的抑菌效果 图3表明,黑松针叶乙醇提取物对3种霉菌都有一定的抑制作用,但抑菌效果与质量浓度不成正比;最佳抑菌质量浓度因霉菌种类而异。黑曲霉在6.25 g/L时,抑菌效果最明显,抑菌圈直径为14.8 mm;青霉在25.0 g/L时,抑菌效果最明显,抑菌圈直径为16.6 mm;根霉在12.5 g/L时,抑菌效果最明显,抑菌圈直径为12.6 mm。黑松提取物对3种霉菌的抑制作用中,青霉最强,黑曲霉次之,根霉最弱。上述结果与吴永华等的研究吻合^[16],针叶提取物具有明显的抗霉菌活性。针叶乙醇提取物的抗霉菌活性与浓度的关系,针叶提取物对霉菌的抑制作用主要是受到针叶提取物中化学成分的影响^[17]。同等浓度和同等条件下,乙醇提取物的抗霉菌活性大于丙酮提取物及

水提取物,原因可能为:针叶提取物中的抗霉菌物质与乙醇的相容性高于以水、丙酮为溶剂的相容性。章光明等^[18]利用水溶液提取法鉴别出松针中含有44种主要挥发油成分,主要为单萜和倍半萜;李保明等^[19]采用分级萃取的方法对松针提取物进行鉴定,结果表明:新鲜松针中有65种组分,其主要组分是烷烃、烯酸、烯酮、甾醇类,而干枯松针的组分有44种,其主要成分是烷酸、酮类、甾醇类,其中甾醇类物质的含量比较高。综上所述,各种针叶提取物均可对3种霉菌产生抑菌效果,抑菌效果上的差异,可能与针叶提取物的成分构成有关。

2.2 黑松针叶提取物的最低抑菌浓度和最佳抑菌浓度 表1表明,无菌水无抑菌作用,黑松水提取物、丙酮提取物、乙醇提取物对3种霉菌的最低抑菌浓度一致,在0.80 g/L时均有抑菌效果,其中乙醇提取物的抑菌效果最强,丙酮提取物次之,水提取物最弱。

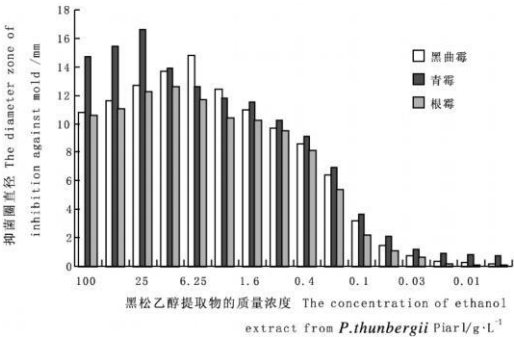


图3 黑松乙醇提取物对3种霉菌的抑制效果
Fig.3 Antifungal activity of ethanol extracts of *P. thunbergii* needles

黑松不同提取物的最低抑菌质量浓度和最佳抑菌质量浓度								
Table 1 Minimum inhibitory concentration and optimal moldal concentration of different extracts from <i>P. thunbergii</i> Parl.								
菌种	最低抑菌质量浓度 Bacteria Minimum inhibitory concentration / g · L ⁻¹				最佳抑菌质量浓度 Best inhibitory concentration / g · L ⁻¹			
	无菌水	水提取物	丙酮提取物	乙醇提取物	无菌水	水提取物	丙酮提取物	乙醇提取物
黑曲霉	—	0.8	0.8	0.8	—	3.1	25	6.25
Aspergillus niger	—	0.8	0.8	0.8	—	100	100	50
青霉	—	0.8	0.8	0.8	—	6.25	50	25
Penicillium	—	0.8	0.8	0.8	—	6.25	50	25
根霉	—	0.8	0.8	0.8	—	6.25	50	25
Rhizopus	—	0.8	0.8	0.8	—	6.25	50	25

3 结论
黑松针叶的水提取物,丙酮提取物,乙醇提取物都有一定的抑菌作用,说明针叶提取物中既有脂溶性,又有水溶性抗霉菌物质;抑菌效果与黑松提取物的质量浓度的关系与菌株、提取物、提取方法等有关。
黑松针叶提取物的最低抑菌质量浓度和最佳抑菌质量浓度因霉菌种类的不同而不同,针叶提取物对青霉的抑制效果最明显;其中,黑松针叶乙醇提取物的抑菌效果最强,丙酮提取物次之。
松叶提取物具有抗霉菌的活性,可能是由于松叶提取物中含有脂溶性和水溶性抗霉菌活性物质,有研究表

明马尾松松叶具有抑菌作用^[20]。但日本五针松、赤松、白皮松、火炬松等松的抑菌作用,松叶提取物的化学成分以及松叶提取物的生物学活性和抑菌机理有待进一步研究和探讨。
长期以来,化学农药的滥用产生了一系列的公害问题,如环境污染、人畜中毒、杀伤天敌、破坏生态平衡、“3R”(Residue、Resistance、Resurgence)等^[1],因此,从植物中探寻具有抗病性的活性物质具有十分重要的意义。松属植物在我国资源丰富,故可以利用松叶开发低毒的环保型植物源天然杀菌剂。松叶提取物具有抗霉菌活性,但尚未明确抗霉菌活性的具体有效成分。如果能对

提取物的化学成分和结构进行进一步的提纯和鉴定,利用现代分离方法对松叶提取物进行分离纯化,然后进行抗霉菌活性的研究,确定抗霉菌活性的有效成分,将会使植物源杀菌剂进一步拓展,也非常有希望从松针中分离出高活性药物。

应用离体生物测定方法来筛选抑菌植物只是植物杀菌剂研发的第一步^[15],筛选出开发前景较好的抑菌植物后,可利用活性追踪法并采用各种色谱技术对抑菌活性成分进行分离纯化,确定化学结构,进而进行构效分析及仿生合成,最终开发出高效、稳定、环境友好的新型杀菌剂。

参考文献

- [1] 吴小芹,张艺,陈蔚诗,等.黑松13个抗病家系对松材线虫的抗性反应及组织病理学观察[J].植物病理学报,2008,38(1):44-50.
- [2] 福山,白音达来,包香梅.使用农药对人类的危害及预防措施[J].内蒙古科技与经济,2002,10(3):101-105.
- [3] Atsushieda Harada K, Ohmorieta S. Occupational Allergic Hazards of Agricultural Chemicals and Its Prevention[J].环境与职业医学,2005,22(4):320-325.
- [4] Brandt L. Developmental and reproductive toxicity of persistent environmental pollutants[J]. Arch Toxicology, 1998, 20(1): 111-119.
- [5] Garey J, Mary S. Wolff. Estrogenic and antiprogesterone activity the insecticide fenitrothion[J]. Appl Toxicology, 2001, 21(3): 173-178.
- [6] 陈良昌,李放平,吴友珍,等.几种新农药防治马尾松毛虫试验[J].湖南林业科技,1990(7):53-57.
- [7] 刘云忠.科学合理使用农药[J].植物卫生,2007,20(1):42-45.

- [8] 陈平.职业卫生与应急救援[J].2003,21(3):125-128.
- [9] 杨义均,董慧,徐兴.植物源杀菌剂的研究现状与展望[J].河北农业科学,2008,12(1):53-57.
- [10] Arraga A M, Machado M I L, Craveiro A A, et al. Oil analysis of Guazuma ulmifolia leaves[J]. Rev Brasile Fam, 1996, 77(19):45-46.
- [11] Ark P A, Thompson J P. Control of Certain Diseases of Plants with Antibiotics from Garlic (*Allium sativum* L)[J]. Plant Dis Rep, 1959, 43(9): 276-282.
- [12] 于杨,尹卫.植物源杀菌剂国内外研究发展[J].湖北农业科学,2006,45(3):382-384.
- [13] 徐宜宏,纪明山,张玉芬,等.植物源杀菌剂的研究进展[J].世界农药,2000,28(2):41-44.
- [14] 毛胜凤,张立钦,张键,等.马尾松叶提取物的抗菌活性[J].浙江林学院学报,2008,25(3):359-362.
- [15] 齐军山,陈靠山,李美,等.40种杂草的丙酮提取物对3种植物病原真菌的抑菌活性[J].植物资源与环境学报,2008,17(3):49-52.
- [16] 吴永华,刘艳红,李俊青.3种不同植物多酚提取物的抗真菌活性研究[J].科学技术与工程,2005,15(5):15-18.
- [17] 战宇,宁正祥.溪黄草提取物抑菌效果研究[J].Science and Technology of Food Industry, 2003, 24(10):61-63.
- [18] 章光明.厦门马尾松松针精油特征及其动态[J].厦门大学学报,2002,41(5):584-588.
- [19] 李保民.学松松针挥发油成分分析[J].化工时刊,2005,19(3):1-3.
- [20] 毛胜凤,张立钦,张键,等.马尾松叶提取物的抗菌活性[J].浙江林学院学报,2008,25(3):359-362.
- [21] Schultz Hunter M, Appel H. Antimicrobial activity of polyphenols medicines plant herbivore interaction[J]. Plant Polyphenol, 1992, 621-638.

Studies on Antifungal Activities of Extracts from *Pinus thunbergii* Needles

SUN Hong-ying, LU Xue-mei, LI Juan, HAN Xiao-di

(Marine College, Shandong University at Weihai, Weihai, Shandong 264209, China)

Abstract: Filter paper discs were placed on the agar surface. The antifungal activity from *Pinus thunbergii* needles was evaluated by agar diffusion bioassay. Results showed that the extracts of *P. thunbergii* needles had antifungal activity; All extracts, depending on their concentrations and solvents, showed different resistances to mold. The optimal antifungal activity differs because of different solvents and concentrations; Among the three kinds of extracts, ethanol extract had the highest resistance and aqueous extract the lowest. When the ethanol extract concentration of *P. thunbergii* needles was 6.25 g/L, it had a 14.8 mm diameter zone of inhibition against *Aspergillus niger*; when the ethanol extract concentration of the pinus needles was 25.0 g/L, it had a 16.6 mm diameter zone of inhibition against *Penicillium glaucum*; when the ethanol extract concentration of *P. thunbergii* needles was 12.5 g/L, it had a 12.6 mm diameter zone of inhibition against *Rhizopus nigricans*.

Key words: *Pinus thunbergii* Parl.; Extract; Antifungal activity; Zone of inhibition