

# 迷迭香酸对几种植物病原真菌的抗菌活性\*

郭道森<sup>1</sup> 杜桂彩<sup>2</sup> 李 丽<sup>1</sup> 李荣贵<sup>1\*\*</sup>

(青岛大学生物系 青岛 266071)<sup>1</sup>

(青岛大学天然产物研究所 青岛 266071)<sup>2</sup>

**摘要:**研究了迷迭香酸对不同植物病原真菌菌丝生长和孢子萌发的抑制活性。试验结果表明,迷迭香酸对供试的 8 种植物病原真菌菌丝生长均有抑制作用,其中对番茄灰霉病菌、芒果灰斑病菌、柑桔青霉和梨黑斑病菌抑制作用较强,EC<sub>50</sub> 分别为 615.04  $\mu\text{g/mL}$ 、698.23  $\mu\text{g/mL}$ 、714.50  $\mu\text{g/mL}$  和 809.10  $\mu\text{g/mL}$ ;对杉木猝倒病菌和苹果树腐烂病菌抑制作用次之,EC<sub>50</sub> 分别为 1039.92  $\mu\text{g/mL}$  和 1044.72  $\mu\text{g/mL}$ ;对松枯梢病菌和种实霉烂病菌的抑制作用较弱,EC<sub>50</sub> 分别为 1256.90  $\mu\text{g/mL}$  和 1270.87  $\mu\text{g/mL}$ 。迷迭香酸对供试的 6 种植物病原真菌孢子萌发也有明显的抑制作用,EC<sub>50</sub> 大致在 400 ~ 700  $\mu\text{g/mL}$  范围,其中对梨黑斑病菌孢子萌发抑制作用最强,EC<sub>50</sub> 为 395.37  $\mu\text{g/mL}$ 。

**关键词:**迷迭香酸,植物病原真菌,抗菌活性

**中图分类号:**S432.44 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2654 (2004) 04-0071-06

## Inhibitory Activities of Rosmarinic Acid Against Plant Pathogenic Fungi

GUO Dao-Sen<sup>1</sup> DU Gui-Cai<sup>2</sup> LI Li<sup>1</sup> LI Rong-Gui<sup>1\*\*</sup>

(Department of Biology, Qingdao University, Qingdao 266071)<sup>1</sup>

(Institute of Natural Products, Qingdao University, Qingdao 266071)<sup>2</sup>

**Abstract:** To clearly define the antifungal activities of rosmarinic acid (RosA), the EC<sub>50</sub> values on eight plant pathogenic fungi, *Sphaeropsis sapinea*, *Valsa mali*, *Pestalotiopsis mangiferae*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria kikuchiana*, *Penicillium citrinum*, *Aspergillus niger* were examined. The results showed that RosA had strong inhibitory effects on the hyphal growth of *Botrytis cinerea*, *Pestalotiopsis mangiferae*, *Penicillium citrinum* and *Alternaria kikuchiana* with the EC<sub>50</sub> values of 615.04  $\mu\text{g/mL}$ , 698.23  $\mu\text{g/mL}$ , 714.50  $\mu\text{g/mL}$  and 809.10  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. The EC<sub>50</sub> values of RosA on the other four plant pathogenic fungi tested were between 1,000  $\mu\text{g/mL}$  and 1,300  $\mu\text{g/mL}$ . RosA also significantly inhibited conidium germination of all six plant pathogenic fungi studied with the EC<sub>50</sub> values ranging approximately from 400 to 700  $\mu\text{g/mL}$  depending on the fungal species.

**Key words:** Rosmarinic acid, Plant pathogenic fungi, Antifungal activities

21 世纪是环保的世纪,以高效、低毒农药逐步替代传统的高毒农药是农药发展的必然趋势。由于植物源杀菌剂具有不污染环境,对人畜安全,害虫不易产生抗性等特点,所以从植物中寻找新型的具有杀菌活性的天然化合物,并对其进行适当的结构修饰,筛选出生物活性更高的新化合物,是当前国际上十分活跃的研究领域。

迷迭香酸(Rosmarinic acid, 简称 RosA)是一种天然的酚酸类化合物,广泛分布在迷迭香、紫花罗勒和紫苏等植物中。国内外的研究证明,迷迭香酸有许多医药功能,

\* 青岛市科技计划资助项目 (No. 03-2-NN-2)

\*\* 联系人 Tel: 0532-5953710, E-mail: rongguili@yahoo.com

收稿日期: 2003-08-25, 修回日期 2003-11-28

对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌等具有较强的抑制作用。此外,迷迭香酸还广泛用于香料及调味品、功能型保健品、食品、日用化工等行业中<sup>[1,2]</sup>。迷迭香酸的开发应用,引起了科学界的极大兴趣,受到国际相关领域的广泛重视。

虽然迷迭香酸在医药、食品工业等领域已显示出良好的应用前景,但在抗真菌活性方面的研究鲜见报道。本文选用8种重要的植物病原真菌为生测对象,开展迷迭香酸抗真菌活性的研究,以期为进一步研究迷迭香酸的生物活性及其在植物源农药方面的开发利用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试迷迭香酸

迷迭香酸纯品由青岛大学天然产物研究所提供。

### 1.2 供试病原菌

松枯梢病菌 (*Sphaeropsis sapinea*)、苹果树腐烂病菌 (*Valsa mali*)、芒果灰斑病菌 (*Pestalotiopsis mangiferae*)、杉木猝倒病菌 (*Fusarium oxysporum*)、番茄灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*)、梨黑斑病 (*Alternaria kikuchiana*)、柑桔青霉 (*Penicillium citrinum*) 和种实霉烂病菌 (*Aspergillus niger*)。

上述菌株除松枯梢病菌由南京林业大学病理室提供外,其余均由西南林学院病理室提供。

### 1.3 毒力测定方法

**1.3.1 抑制菌丝生长试验:**采用平板菌丝生长抑制法。用少量的无水乙醇(占溶剂总量的10%)将迷迭香酸完全溶解后,加入一定量的灭菌蒸馏水配成迷迭香酸母液。使用时将母液稀释成系列浓度加入到定量的灭菌后冷却至50℃的PDA培养基中,充分摇匀,配成含迷迭香酸终浓度分别为125、250、500、1,000、2,000  $\mu\text{g/mL}$ 的培养基,以等体积的10%乙醇代替迷迭香酸稀释液加入到PDA培养基中作对照,然后倒入直径为90 mm培养皿内制成平板,备用。用直径5 mm的打孔器从事先在PDA平板上25℃下培养3d的各供试病菌菌落边缘处切取菌饼,并移植于上述含不同浓度的迷迭香酸平板和不含迷迭香酸平板(对照)中央,每处理重复3次,置25℃下培养3d,测量菌落直径。每菌落取相交垂直线方向测其直径,以其均值减去菌饼直径即得到菌落净生长直径。

**1.3.2 抑制孢子萌发试验:**采用载玻片上萌发法。供试孢子为各病菌在25℃下PDA平板上培养5~7d的菌落上产生的分生孢子。杉木猝倒病菌为大型分生孢子来源于分生孢子座,芒果灰斑病菌分生孢子来源于菌落上产生的黑色孢子粘滴。除柑桔青霉和种实霉烂病菌的孢子悬浮液是用灭菌的1%葡萄糖液配制外,其余病菌均采用灭菌蒸馏水配制,孢子浓度为在显微镜低倍镜(10×10)下每视野有100~120个孢子。将迷迭香酸母液稀释至一系列所需浓度,取等量的迷迭香酸溶液和孢子悬浮液各一滴滴在凹玻片上,充分混合,使迷迭香酸终浓度依次为250、375、500、750、1,000  $\mu\text{g/mL}$ 。以孢子悬浮液中加入等体积的10%乙醇作对照,每一处理重复4次。将各处理置25℃恒温下保湿培养,每隔4h镜检对照孢子萌发情况,当对照孢子萌发率达到最高时,镜检各处理的孢子萌发情况,每处理随机选取200个孢子,以芽管长度超过孢子短径二分之一时视为萌发,统计萌发率。

**1.3.3 抑菌试验分析统计方法：**根据各处理和对照菌落净生长直径和孢子萌发率求出抑制百分率，然后以浓度对数——抑制百分率机率值求出回归直线方程。根据方程求出  $EC_{50}$ （抑制中浓度），以  $EC_{50}$  作为衡量迷迭香酸对不同植物病原真菌菌丝生长和孢子萌发抑制活性大小的指标。

2 结果与分析

2.1 迷迭香酸对病菌菌丝生长的影响

对迷迭香酸抑制不同植物病原真菌菌丝生长活性的测定结果见表 1。从表 1 可以看出，迷迭香酸对所有 8 种供试植物病原真菌菌丝生长均有一定的抑制作用，但对不同的病菌表现有所差异，对番茄灰霉病菌、芒果灰斑病菌、柑桔青霉和梨黑斑病菌抑制作用较强， $EC_{50}$  分别为 615.04  $\mu\text{g/mL}$ 、698.23  $\mu\text{g/mL}$ 、714.50  $\mu\text{g/mL}$  和 809.10  $\mu\text{g/mL}$ ；对杉木猝倒病菌和苹果树腐烂病菌抑制作用次之， $EC_{50}$  分别为 1,039.92  $\mu\text{g/mL}$  和 1044.72  $\mu\text{g/mL}$ ；对松枯梢病菌和种实霉烂病菌的抑制作用较弱， $EC_{50}$  分别为 1,256.90  $\mu\text{g/mL}$  和 1,270.87  $\mu\text{g/mL}$ 。

表 1 迷迭香酸对植物病原真菌菌丝生长的抑制作用

病原菌	浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	菌落净生长直径 (mm)	抑制率 (%)	$y = a + bx$	$EC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	r
<i>Pestalotiopsis mangiferae</i>	2,000	12.1	76.0	$y = 0.4210 + 1.6100x$	698.23	0.9924
	1,000	20.3	59.8			
	500	30.5	39.6			
	250	36.0	28.7			
	125	45.6	9.7			
	CK	50.5				
<i>Fusarium oxysporum</i>	2,000	18.7	66.4	$y = 0.6160 + 1.4533x$	1039.92	0.9924
	1,000	26.7	52.1			
	500	39.3	29.4			
	250	46.7	16.2			
	125	49.7	10.8			
	CK	55.7				
<i>Botrytis cinerea</i>	2,000	9.2	73.9	$y = 0.9190 + 1.4633x$	615.04	0.9880
	1,000	11.0	68.8			
	500	20.1	42.9			
	250	25.3	28.1			
	125	29.8	15.3			
	CK	35.2				
<i>Alternaria kikuchiana</i>	2,000	13.0	70.0	$y = 0.4350 + 1.5700x$	809.10	0.9851
	1,000	19.0	56.0			
	500	25.3	41.6			
	250	32.3	25.4			
	125	40.0	7.6			
	CK	43.3				
<i>Penicillium citrinum</i>	2,000	8.3	74.0	$y = 1.1850 + 1.3367x$	714.50	0.9777

续表 1

<i>Aspergillus niger</i>	1,000	15.7	52.4	$y = 1.4200 + 1.5330x$	1270.87	0.9922
	500	19.0	42.4			
	250	21.7	34.2			
	125	28.7	13.0			
	CK	33.0				
	2,000	16.7	60.9			
	1,000	25.0	41.5			
	500	29.3	31.4			
	250	32.7	23.4			
	125	37.7	11.7			
<i>Sphaeropsis sapinea</i>	CK	42.7		$y = -0.7440 + 1.8533x$	1256.90	0.9985
	2,000	30.2	62.8			
	1,000	45.5	43.8			
	500	62.0	23.5			
	250	72.3	10.7			
	125	78.7	2.8			
	CK	81.0				
	2,000	14.0	64.4			
	1,000	20.3	48.4			
	500	26.0	33.8			
<i>Valsa mali</i>	250	30.3	22.9	$y = 1.9800 + 1.1600x$	1044.72	0.9970
	125	33.3	15.3			
	CK	39.3				

2.2 迷迭香酸对病菌孢子萌发的影响

每种病菌孢子萌发试验的培养时间视对照中孢子萌发情况而定。经测试确定芒果灰斑病菌、杉木猝倒病菌和梨黑斑病菌培养时间为 8 h，番茄灰霉病菌和柑桔青霉为 12 h，种实霉烂病菌为 24 h。抑制孢子萌发试验结果见表 2。由表 2 可知，迷迭香酸对 6 种供试植物病原真菌孢子萌发均有明显的抑制作用，EC<sub>50</sub>大致在 400 ~ 700 μg/mL 之间。迷迭香酸对不同的病菌其抑制孢子萌发的活性也有所差异，其中对梨黑斑病菌孢子萌发抑制作用最强，对柑桔青霉孢子的萌发抑制作用最弱，其 EC<sub>50</sub>分别为 395.37 μg/mL 和 700.65 μg/mL。

表 2 迷迭香酸对植物病原真菌孢子萌发的抑制作用

病原菌	浓度 (μg/mL)	萌发率 (%)	抑制率 (%)	$y = a + bx$	EC <sub>50</sub> (μg/mL)	r
<i>Pestalotiopsis mangiferae</i>	1,000	8.3	91.5	$y = -11.3160 + 5.9096x$	576.77	0.9930
	750	18.3	81.2			
	500	70.1	28.0			
	375	85.7	11.9			
	250	95.3	2.1			
	CK	97.3				
<i>Fusarium oxysporum</i>	1,000	0	100	$y = -15.3660 + 7.6838x$	447.71	0.9918

续表 2

	750	4.2	95.8			
	500	29.5	70.3			
	375	80.3	19.1			
	250	96.0	3.4			
	CK	99.3				
<i>Botrytis cinerea</i>	1,000	4.7	95.1	$y = -6.3241 + 4.2603x$	455.09	0.9870
	750	20.5	78.5			
	500	47.0	50.1			
	375	62.2	34.7			
	250	79.3	16.7			
	CK	95.2				
<i>Alternaria kilauchiana</i>	1,000	3.0	96.9	$y = -4.7646 + 3.7600x$	395.37	0.9494
	750	24.0	72.0			
	500	32.5	66.2			
	375	52.0	45.8			
	250	71.5	25.5			
	CK	96.0				
<i>Penicillium citrinum</i>	1,000	18.9	80.5	$y = -7.4012 + 4.3582x$	700.65	0.9855
	750	49.3	49.1			
	500	78.0	19.4			
	375	82.5	14.8			
	250	94.1	2.8			
	CK	96.8				
<i>Aspergillus niger</i>	1,000	4.6	84.8	$y = -5.9079 + 3.9059x$	620.44	0.9796
	750	40.5	57.9			
	500	70.0	27.2			
	375	77.4	19.5			
	250	88.3	8.2			
	CK	96.2				

综合上述试验结果可以看出，迷迭香酸对植物病原真菌孢子萌发的抑制活性明显高于对菌丝生长的抑制活性，也就是说这些病菌在菌丝生长和孢子萌发阶段对迷迭香酸的敏感性有所不同。

3 讨论

迷迭香酸是一种天然酚酸类化合物，最早由 Ellis 在迷迭香这种植物中发现的，故而得名。现已发现迷迭香酸在植物中分布广泛，从高等双子叶植物到低等苔藓类、蕨类植物都有报道，但主要存在于唇形花科和紫草科植物中<sup>[3]</sup>。研究表明，迷迭香酸具有抗病毒、抗细菌、抗炎和抗氧化等多种生物活性<sup>[1,3]</sup>。Arda 等<sup>[4]</sup>发现变豆菜的醇水提取物具有抗 HIV 的活性，其中起作用的主要物质是迷迭香酸。Mazumder 等<sup>[5]</sup>的研究进一步表明，迷迭香酸能抑制 HIV-1 整合酶的活性。Hangay 等<sup>[6]</sup>的研究表明迷迭香酸是控制疱疹病的一种有效成份，迷迭香酸的抗病毒活性除抑制病毒生活周期中某些酶活性

外,它还能迅速与病毒外壳蛋白结合,从而使病毒失活。李荣贵等<sup>[2]</sup>从紫苏愈伤组织中分离出迷迭香酸,并证明其具有较强的抗大肠杆菌和金黄色葡萄球菌等细菌活性和一定的抑制立枯丝核真菌的作用。上述文献表明,以往对迷迭香酸的生物活性研究主要集中在抗细菌和病毒等方面,而对其抗真菌活性的研究较少。本文报道了迷迭香酸对8种植物病原真菌菌丝生长和6种植物病原真菌孢子萌发的抑制活性。该结果和已有的研究文献说明迷迭香酸具有广谱的抗微生物活性,深入研究迷迭香酸的生物活性将有力地促进其在医药、农药等方面的开发应用。

迷迭香酸虽然对植物病原真菌有抑制活性,但在本试验中对病菌菌丝生长的抑制活性,明显不如对其孢子萌发的抑制活性强,而且对不同真菌种类的抑制活性,也存在着一定的差异,尤其在抑制菌丝生长方面表现更加明显,进一步对其抑制机理的研究将有助于理解这些差异的原因。我们在研究中还发现迷迭香酸抗菌活性具有很强的热稳定性和耐低温贮藏性。高温处理和低温贮藏试验表明,迷迭香酸的水溶液在80℃水浴中处理30 min或4℃低温贮藏1年其抑菌活性未发生明显的变化。

植物是生物活性化合物的天然宝库,其产生的众多代谢产物如萜烯类、生物碱、类黄酮、甾体、酚类、独特氨基酸和多糖等均有抗菌活性。从植物中寻找具抗菌活性的天然化合物并以其为先导化合物,通过化学修饰和类推合成筛选得出高效、无毒或低毒、无残留或低残留的新型无公害杀菌剂是目前国际上研究的一个热点。目前国内对植物中抗植物病原真菌成分的研究多数尚处于对粗提物的生测阶段,对其有效成分的研究报道较少。孟昭礼等<sup>[7]</sup>发现,在银杏叶中有高抑菌活性物质,并开发出了植物性杀菌剂“银泰”乳油。吴恭谦等<sup>[8]</sup>研究表明,原白头翁素对禾谷镰刀菌抑制作用很强。赵博光等<sup>[9]</sup>发现苦豆草中的7种生物碱对杉炭疽菌分生孢子萌发均具有较强的抑制活性,EC<sub>50</sub>在24.0~227.0 μg/mL范围。魏启华等<sup>[10]</sup>研究表明,披针叶黄华中的鹰爪豆碱对供试的7种植物病原真菌均有不同程度的抑菌活性,对孢子萌发的EC<sub>50</sub>为22.0~249.0 μg/mL,对菌丝生长的EC<sub>50</sub>为191.0~1258.0 μg/mL。

本次试验研究了迷迭香酸对几种植物病原真菌的离体抗菌活性,有关其作用方式、作用机制以及在活体植物上的抗菌活性还有待于进一步研究。

### 参考文献

- [1] Ahn S C, Oh W K, Kim B Y, *et al.* *Planta Med*, 2003, **69** (7): 642~646.
- [2] 李荣贵, 滕大为, 杜桂彩, 等. *微生物学通报*, 2000, **27** (5): 324~327.
- [3] Petersen M, Simmonds M S J. *Phytochemistry*, 2003, **62** (2): 121~125.
- [4] Arda N, Goeren N, Kuru A, *et al.* *J Nat Prod*, 1997, **60** (11): 1170~1173.
- [5] Mazumder A, Neamati N, Sunder S, *et al.* *J Med Chem*, 1998, **40** (19): 3057~3063.
- [6] Hangay G, Kelen A, Keseru P, *et al.* *Olaj Szappan Kozmet*, 1994, 30~32.
- [7] 孟昭礼, 罗兰, 尚坚. *莱阳农学院学报*, 1999, **9** (2): 48~52.
- [8] 吴恭谦, 张超, 吴越环. *安徽农学院学报*, 1989, **16** (1): 21~31.
- [9] 赵博光, 蒋继宏. *林业科学*, 1999, **35** (5): 62~67.
- [10] 魏启华, 赵博光, 郭道森. *南京林业大学学报*, 2001, **25** (5): 85~88.