

炭团菌提取物对樟子松枯梢病菌的抑菌活性及稳定性

宋瑞清*, 高海燕

(东北林业大学林学院, 哈尔滨 150040)

摘要: 【目的】获得炭团菌液体培养菌液中高效抑制樟子松枯梢病菌的活性物质。【方法】炭团菌液体培养菌液中活性物质的提取采用水提和酯提 2 种方式。水提方式采用直接提取法和超声波提取法 2 种方法, 酯提方式选择正丁醇、乙酸乙酯、乙醇 3 种萃取剂。各提取物对病原菌的抑菌活性研究选用菌丝生长抑制率和孢子萌发抑制率 2 个指标, 对病原菌菌丝生长的抑制测定采用生长速率法, 对病原菌孢子萌发的抑制试验采用悬滴法。炭团菌液体培养菌液乙酸乙酯提取物稳定性的研究选用紫外线、温度、pH 值、氧化剂与还原剂以及贮存时间 5 个因子。乙酸乙酯提取物中抑菌活性成分的分离采用柱层析、纯化采用薄层层析、结构鉴定采用紫外光谱 (UV)、红外光谱 (IR)、气质联用 (GC-MS) 和核磁共振 (NMR) 等分析测试技术。【结果】炭团菌液体培养菌液 5 种提取物对樟子松枯梢病菌均有一定的抑菌活性, 其中乙酸乙酯提取物对病原菌菌丝生长的抑制率最高, 达到 73.20%; 乙酸乙酯提取物、超声波提取物、正丁醇提取物对病原菌孢子萌发抑制率均超过 90%。乙酸乙酯提取物对自然环境下的紫外线、温度具有很高的稳定性, 并且具有一定的抗氧化还原能力和良好的耐热性, 长期贮存不影响其抑菌活性。乙酸乙酯提取物中有 3 个组分, 组分 I 的抑菌率最高 (72.94%)。组分 I 含 3 种化合物, 其中得率最高 (57.952%) 的为对甲氧基肉桂酸甲酯, 化学式为 $C_{11}H_{12}O_3$ 。其他两种化合物为邻苯二甲酸二丁酯和邻苯二甲酸二异丁酯。本研究首次发现上述 3 种化合物的天然存在。【结论】炭团菌液体培养菌液乙酸乙酯提取物对樟子松枯梢病菌具有较高的抑菌活性, 在自然环境下具有很高的稳定性, 具有很高的开发价值和应用前景, 其主要抑菌活性成分为对甲氧基肉桂酸甲酯。对甲氧基肉桂酸甲酯作为医药中间体主要用于化妆品中, 作紫外防护吸收剂; 邻苯二甲酸二丁酯和邻苯二甲酸二异丁酯均是聚氯乙烯最常用的增塑剂。上述 3 种化合物天然存在的发现, 对于医药工业和化学工业具有极为重要的意义。

关键词: 炭团菌 (*Hypoxyylon perforatum*); 提取物; 樟子松枯梢病菌 (*Sphaeropsis sapinea*); 抑菌活性; 稳定性
中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2009) 07-0910-08

由松球壳菌 (*Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dyko et Sutton) 引起的松枯梢病是一种世界上广泛分布、危害严重的病害^[1-3], 世界上有 30 多个国家和地区报道了该病的发生和为害, 其中南非、美国、新西兰、澳大利亚和中国等国家的松林发病较为严重。我国自 1980 年广东报道该病发生以来, 先后在十几个省份

都发现了该病, 湖南、湖北、江西、福建、江苏等省都因该病引起松树大面积枯死, 造成了较大的经济损失。该病已成为当前我国南方各省发展松树人工林的障碍之一^[4]。

樟子松是我国三北地区特别是风沙区的主要针叶造林树种, 到 1993 年底全国樟子松引种造林面积

基金项目: 国家“十一五”科技攻关项目专题 (2006BAD08A11105); 国家自然科学基金 (30271083); 黑龙江省国际合作项目 (WC05C01)

作者简介: 宋瑞清 (1964-), 女, 黑龙江人, 教授, 博士生导师, 主要从事森林保护及菌物开发利用等研究; Tel: +86-451-87500537; E-mail: songrq1964@163.com

收稿日期: 2009-02-20; 修回日期: 2009-04-23

达 63 万 hm^2 [5]。近 10 年来,黑龙江、吉林、辽宁各省普遍发生樟子松枯梢病,引起樟子松人工林成片枯死 [6]。仅辽宁西北发病面积就达 2.47 万 hm^2 (占总面积的 65%)。另外,吉林、黑龙江等地也出现了类似情况 [7-9]。我国学者已对樟子松枯梢病菌的生物学特性、致病性、发生流行规律、发病机理和化学防治技术及生态控制技术进行了一系列的深入研究,然而目前枯梢病的防治,在极大程度上还是依赖于化学防治,这虽然给林业生产带来很高的效益,但环境污染、生态系统自然平衡的破坏等诸多弊端也随之而来。因此,寻找高效的生物防治技术已刻不容缓 [10]。

本研究通过炭团菌各类提取物对樟子松枯梢病菌的影响试验,筛选高效抑菌活性物质,用于樟子松枯梢病的生物防治,为开发新型生物防治农药奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源:炭团菌 [*Hypoxyylon perforatum* Schwein.: Fr.) Fr.] 菌株由东北林业大学森林病理教研室提供,前期试验证明对樟子松枯梢病菌 (*Sphaeropsis sapinea*) 生长及繁殖具有显著的抑制作用;樟子松枯梢病菌 (*Sphaeropsis sapinea*) 菌株采自东北林业大学帽儿山实验林场。

1.1.2 培养基:改良 PDA 培养基和改良 PD 液体培养基 [11]。

1.2 样品的制备

用直径 10 mm 的无菌打孔器,无菌条件下切取改良 PDA 平板培养基上培养 7 d 的炭团菌菌落,接种于盛有 250 mL 液体培养基的三角瓶 (500 mL) 中,每瓶接种 6 片。置 25℃、160 r/min 摇床中恒温水浴培养 10 d,得到液体培养菌液。对液体培养菌液的提取采用水提和酯提两种方式。

1.2.1 水提样品的制备:采用直接提取法及超声波提取法 2 种方法。

将培养 10 d 的液体培养菌液用无菌纱布过滤后,无菌条件下通过 Millex-HV Filter Unit 除菌滤膜 (孔径为 0.22 μm),过滤除菌后得到水提样品。

将培养 10 d 的液体培养菌液经超声波振荡提取 50 min 后,用无菌纱布过滤,取滤液,无菌条件下通过 Millex-HV Filter Unit 除菌滤膜 (孔径为 0.22 μm),过滤除菌后得到超声波提取样品 [11-12]。

1.2.2 酯提样品的制备:将培养 10 d 的液体培养菌

液用无菌纱布过滤后,分别与正丁醇、乙酸乙酯、乙醇按 1/3 (W/V) 比例混合,常温下静止放置 5 d。正丁醇和乙酸乙酯萃取后弃下层滤液,将上层有机溶剂分别以 60℃、30℃真空旋转蒸发除去溶剂得到固体样品;将固体样品用吐温 80 溶解,恢复为培养过滤液体积的 1/10。由于乙醇与过滤后的菌液互溶,所以将全部液体在 40℃下真空旋转蒸发,除去溶剂得固体样品,然后用吐温 80 溶解,恢复为原滤液体积的 1/10 [13]。

1.3 炭团菌液体培养菌液提取物的抑菌活性

各提取物对病原菌菌丝生长的抑制试验采用平板表面涂抹法,对病原菌孢子萌发的抑制试验采用悬滴法 [13-14]。采用 Spss 软件中 LSD 方法进行差异显著性分析 ($P < 0.05$)。

1.3.1 对病原菌菌丝生长的抑制:各提取物对病原菌菌丝生长的抑制测定采用生长速率法 [11,13]。

将 200 μL 提取物均匀涂抹在改良 PDA 平板培养基表面,待表面自然干后,切取直径 6 mm 的病原菌菌片接种于平板中心,置于 25℃下培养,以十字交叉法定时测量菌落直径。以无菌水涂抹改良 PDA 平板培养基上生长的菌落作为对照,每处理 3 个平板,重复 3 次。根据下式计算抑菌率 [15-16]:

$$\text{抑菌率} = (\text{对照净生长量} - \text{处理净生长量}) / \text{对照净生长量} \times 100\%$$

1.3.2 对病原菌孢子萌发的影响:分别取各提取物 (含 2% 葡萄糖) 及病原孢子悬浮液 (每视野 40~50 个孢子) 各 20 μL 滴于载玻片上并混合,将载玻片放于保湿器中,置于 25℃恒温箱中培养,每 24 h 观察 1 次,记录孢子萌发情况。以 2% 葡萄糖溶液与病原菌孢子液的混合作为对照,每处理 3 个载片,重复 3 次。根据公式计算各提取物对病原菌孢子萌发的抑制率:

$$\text{抑制率} = [\text{对照萌发率} - \text{处理萌发率}] / \text{对照萌发率} \times 100\%$$

1.4 炭团菌液体培养菌液乙酸乙酯提取物的稳定性研究

试验采用平板表面涂抹法。对病原菌菌丝生长的抑制测定采用生长速率法。采用 Spss 软件中 LSD 方法进行差异显著性分析 ($P < 0.05$)。

将经过处理 (紫外线照射、温度处理、氧化剂与还原剂处理、不同酸碱处理、不同储存时间) 的样品 200 μL (0.2214 mg/mL) 分别均匀涂抹在改良 PDA 平板培养基表面,待表面自然干后,接种直径为 6 mm 的病原菌菌片,置于 25℃生化培养箱中培养,定期

测量菌落直径大小(十字交叉法)。以无菌水涂抹在 PDA 平板培养基上的菌落生长作为对照,每处理 3 个平板,重复 3 次。

1.4.1 紫外线对样品抑菌活性的影响:将样品经紫外线(波长 253.7 nm,强度 30 W/cm²,距离 60 cm)分别照射 30 min、1 h、2 h,测定紫外线照射后的样品的抑菌率。以未处理的样品作为对照。

1.4.2 温度对样品抑菌活性的影响:将样品分别在 30℃、40℃、50℃、80℃、121℃ 下处理 2 h,测定不同处理样品的抑菌率。以未处理的样品作为对照。

1.4.3 氧化剂与还原剂对样品抑菌活性的影响:将样品配制成分别含 H₂O₂ 与 Na₂SO₃ 浓度为 0.10%、0.50%、1.00%、5.00% (W/V) 的溶液,测定不同处理样品的抑菌率。以未处理的样品作为对照。

1.4.4 pH 值对样品抑菌活性的影响:用 6 mol/L HCl 和 6 mol/L NaOH 将样品的 pH 值分别调为 4、5、6、7、8、9、10,测定不同处理样品的抑菌率。以未处理的样品作为对照。

1.4.5 贮存时间对样品抑菌活性的影响:将样品在自然条件下放置 1 d、2 d 直至 180 d,测定不同贮存时间下样品的抑菌率。

1.5 乙酸乙酯提取物中抑菌活性成分的分离、纯化及结构鉴定

采用柱层析对乙酸乙酯提取物进行分离,采用薄层层析进行纯化,运用化学方法、紫外光谱(UV)、红外光谱(IR)、气质联用(GC-MS)和核磁共振(NMR)等分析测试技术对样品进行结构鉴定。

1.5.1 展开剂的选择:选择展开剂时,根据展开剂的极性、样品的极性及其吸附剂(固定相)的活性三方面来考虑。在三者之中,样品的性质是首要因素,据此考虑吸附剂的活性和展开剂的极性。对于展开剂,选择不当就会出现物质被带到展开剂前缘不形成斑点,成为和展开剂前缘一致的一条带状,即 R_f 值过大;或被留在原点,或上升距离很小,即 R_f 值过小,使分离效果不够好,因此有必要对展开剂进行选择。试验采用毛细管点样,分别以正己烷、乙酸乙酯、甲醇等溶剂的不同组成及其不同比例的混合溶剂为展开剂展层,展层后用碘蒸气显色,观察层析结果来选择最佳溶剂系统。

1.5.2 检测性 TLC:试验采用湿法制板,即将吸附剂(硅胶 G)用一定浓度的粘合剂(羧甲基纤维素钠)调制均匀糊状物涂布在玻璃板上。0.8% 的羧甲基纤维素钠溶液配制方法:取 0.8 g 羧甲基纤维素钠溶于 100 mL 去离子水中,加热煮沸,直至全部溶

解,冷却后备用。用全自动薄层铺板器铺制成 5 cm × 20 cm、硅胶层厚度 0.3 mm 的硅胶板,于室温晾干后,放在恒温干燥箱内 105℃ 活化 30 min,冷却后,将硅胶板在甲醇中展开至顶,取出挥干甲醇,再用同样的方法活化后,用内径小于 1 mm 的毛细管点样,上行法展开,用碘蒸气显色后观察结果。

1.5.3 柱层析:采用硅胶柱层析法分离抑菌活性物质,其原理是利用各种抑菌活性物质单体与硅胶形成氢键的能力不同,以及溶剂对不同抑菌活性物质单体的溶解能力不同,所以其在柱内被洗脱的顺序不同,从而达到分离的目的。固定相为硅胶 G,流动相为以一定比例混合的石油醚与乙酸乙酯混合液。采用分段洗脱的方法,将发酵液提取物在层析柱内展开,以得到抑菌活性物质的各个组分。按照以下步骤操作: ①样品处理:准确称取发酵液乙酸乙酯提取物,用适量甲醇溶解,向该溶液中加入 3.5 g 60~100 目的硅胶,充分搅拌,水浴风干甲醇。②装柱:装好脱脂棉塞,通过漏斗向柱内加入 200~300 目硅胶,使硅胶面保持平整并用真空泵抽紧,然后按同样方法加入处理好的样品,装填均匀并使表面保持平整。最后,加上脱脂棉层。③浸湿:用石油醚将柱子浸湿、浸透。④分离:用通过 TLC 选择的洗脱液冲洗柱子,控制流速,按 7 min 进行收集。用薄层色谱检测,成分相同者合并后减压浓缩,并分别测定得率及抑菌活性,活性较强部分作为下一步骤的起始样品进一步细分。⑤抑菌活性测定:将分离得到的不同组分,用 10% 吐温-80 水溶液配制成一定的浓度,分别采用生长速率法对樟子松枯梢病菌生长进行测定,方法同 1.3.1。

1.5.4 薄层层析(TLC):经柱层析分离收集所得的某些高活性组分仍可能为混合物,有必要用薄层层析制备,分离抑菌活性物质单一组分。

2 结果和分析

2.1 五种提取物对病原菌生长及繁殖的抑制效果

炭团菌液体培养菌液 5 种提取物对病原菌菌丝生长及繁殖均有一定的抑制作用(表 1)。

乙酸乙酯提取物对病原菌菌丝生长抑制效果最好,抑制率为 73.20%;其次为正丁醇提取物,对病原菌抑制率为 60.32%。乙酸乙酯提取物、超声波提取物、正丁醇提取物对病原菌孢子萌发抑制率均超过 90%。

综合炭团菌液体培养菌液 5 种提取物对病原菌菌丝生长及繁殖的抑制效果,将乙酸乙酯提取物作

为对病原菌的高效抑制提取物进行进一步研究。

表 1 5 种提取物对病原菌生长及繁殖的抑制率 (%)

Table 1 The inhibiting rates of five extracts on the growth and germination of *Sphaeropsis sapinea*

Extracts	Growth-inhibiting rates /%	Spore germination-inhibiting rates /%
Extract directly from cultural liquid	45.31	76.42
Extract by ultrasonic	41.85	91.56
Extract by n-butyl alcohol	60.32	90.36
Extract by ethylacetate	73.20	91.63
Extract by alcohol	38.48	51.74

2.2 乙酸乙酯提取物的稳定性

2.2.1 紫外线: 炭团菌液体培养菌液乙酸乙酯提取物经紫外线照射后, 抑菌活性无变化 (图 1)。结果表明, 紫外线对乙酸乙酯提取物中的抑菌物质的抑菌活性无影响。

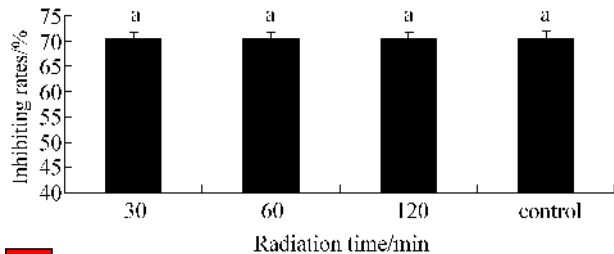


图 1 紫外线对提取物抑菌活性的影响

Fig.1 Effect of ultraviolet radiation on the antifungal activities of the extracts. The different lowercase letters (a, b, c, d) show the significant differences of inhibiting activities among samples of each treatment and control. If the letter is not the same, that shows there is significant difference between two sets of date. Followings the same.

2.2.2 温度: 经 30℃ ~ 80℃ 处理的乙酸乙酯提取物, 其抑菌活性没有明显变化, 与对照相比差异不显著; 121℃ 处理的乙酸乙酯提取物抑菌活性有所下降, 与对照相比下降了 21.18%, 差异显著 (图 2)。结果表明, 乙酸乙酯提取物具有一定的耐热性, 温度在 30℃ ~ 80℃ 之间不影响其抑菌活性; 过高的温度对乙酸乙酯提取物有一定的破坏作用。自然温度对乙酸乙酯提取物不具有破坏作用, 因此在运输、贮存时不必考虑温度的影响。

2.2.3 还原剂和还原剂: 还原剂浓度为 0.1% 和 0.5% 时, 乙酸乙酯提取物对病原菌生长的抑制率无明显变化, 与对照相比无显著差异 (图 3-A)。随着还原剂浓度的增加, 乙酸乙酯提取物对病原菌生长的抑制呈明显下降趋势, 浓度越高, 抑菌率越低。还原剂浓度为 1%、5% 时, 乙酸乙酯提取物的抑菌率分别为 67.06% 和 61.18%, 与对照相比分别下降了

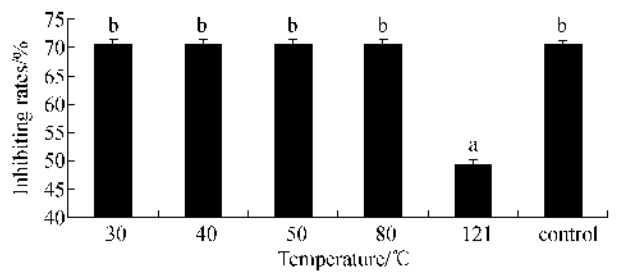


图 2 温度对提取物抑菌活性的影响

Fig.2 Effect of temperature on the antifungal activities of the extracts.

3.53% 和 9.41%。

氧化剂浓度为 0.1% 和 0.5% 时, 乙酸乙酯提取物对病原菌生长的抑制无明显变化, 与对照相比无显著差异 (图 3-B)。当乙酸乙酯提取物中氧化剂浓度为 1% 时, 对病原菌生长的抑制率明显降低, 与对照相比下降了 2.94%。当氧化剂浓度达到 5% 时, 对病原菌生长的抑制率反而提高, 达到 80%, 该结果可能与高浓度氧化剂对病原菌生长有抑制作用有关。

上述结果表明, 低于 0.5% 的氧化剂与还原剂对提取物的抑菌活性没有影响, 提取物具有一定的抗氧化还原能力。

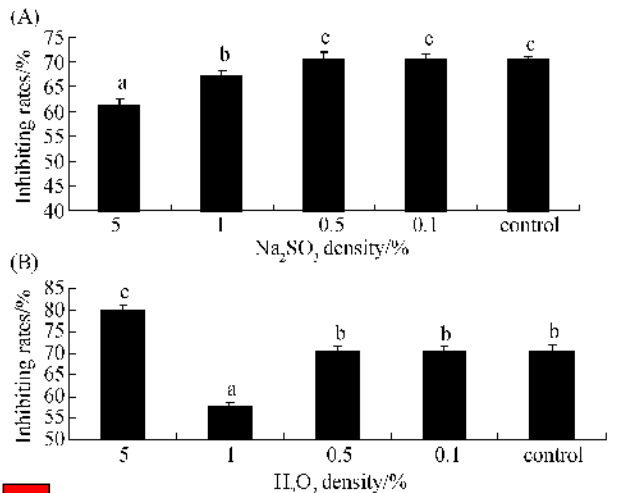


图 3 还原剂 (A) 和氧化剂 (B) 对提取物抑菌活性的影响

Fig.3 Effect of reducer (A) and oxidant (B) on the antifungal activities of the extracts.

2.2.4 pH: 不同 pH 值的乙酸乙酯提取物的抑菌活性有一定的差异 (图 4)。与对照相比, pH 值为 6、7、8 的提取物对病原菌生长抑制率差异均不显著, 抑菌活性相对稳定。pH 值为 4 和 5 时, 与对照相比提取物的抑制率分别下降 14.12% 和 2.35%, pH 值为 9 和 10 时, 提取物的抑制率均下降了 4.71%。结果表明, 强酸强碱对培养菌液乙酸乙酯提取物的抑菌活性有一定的影响。

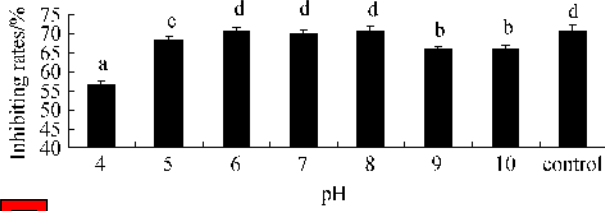


Fig. 4 pH 值对提取物抑菌活性的影响

Effect of pH value on the antifungal activities of the extracts.

2.2.5 贮存时间:贮存 1 d、2 d 直至 180 d 的乙酸乙酯提取物,对病原菌生长抑制率均在 70.59% 左右,与对照相比无显著差异(图 5),该结果表明提取物在 180 d 内自然状态下贮存,不会影响其抑菌活性。

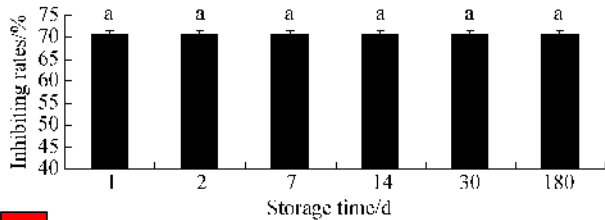


Fig. 5 贮存时间对提取物抑菌活性的影响

Effect of storage-time on the antifungal activities of the extracts.

2.3 乙酸乙酯提取物中抑菌活性成分的分离、纯化及结构鉴定

2.3.1 展开剂的选择:以不同极性的溶剂系统作为展开剂,将发酵液乙酸乙酯提取物进行薄层层析,用碘蒸气显色,来选择最佳展开剂。试验结果表明,当石油醚:乙酸乙酯 = 2:1 的混合溶剂作为展开剂时,效果最好,碘显色下观察,有 7 条带。因此,选择石油醚:乙酸乙酯 = 2:1 的混合溶剂作为展开剂。

2.3.2 发酵液提取物的柱层析分离物及其抑菌活性:以筛选出的展开剂为洗脱剂,对发酵液乙酸乙酯提取物进行硅胶柱层析分离后,得到 3 个组分。经减压浓缩、挥干溶剂后,各组分的得率分别为 5.01%、7.31% 和 6.28% (表 2),对樟子松枯梢病菌菌丝生长抑制率分别为 72.94%、25.88% 和 28.23%。试验结果表明,抑菌活性成分主要存在于组分 I 中,对组分 I 进行进一步的分离。

表 2 发酵液提取物硅胶柱粗分离所得组分的得率及抑菌活性

Table 2 The yields and inhibiting rates of components

Components	Sample weights/g	Components weights/g	Yields/%	Inhibiting rates/%
I	0.6643	0.0333	5.01	72.94
II	0.6643	0.0486	7.31	25.88
III	0.6643	0.0424	6.28	28.23

2.3.3 抑菌活性成分的结构鉴定:将组分 I 进行薄

层检测,结果呈 3 条带;经 GC/MS 分析,从 GC 的色谱峰(图 6-A)上看,有 3 个吸收峰,表明组分 I 含 3 种化合物。化合物 1 的 GC 的色谱图及结构式如图 8 所示,化学式为 $C_{11}H_{12}O_3$,鉴定为对甲氧基肉桂酸甲酯(methyl p-methoxy cinnamate)。化合物 2、3 的 GC 色谱图及结构式如图 6-C、D 所示,化学式均为 $C_{16}H_{22}O_4$ 。化合物 2 为邻苯二甲酸二异丁酯(Diisobutyl phthalate),化合物 3 为邻苯二甲酸二丁酯(Dibutyl phthalate)。三种化合物中,化合物 1 的得率最高,为 57.952%,表明组分 I 的主要成分是化合物 1,化合物 2 和化合物 3 的得率分别为 13.592% 和 28.455%。

3 结论和讨论

炭团菌液体培养菌液直接提取物、超声波提取物、正丁醇提取物、乙酸乙酯提取物和乙醇提取物对樟子松枯梢病菌生长都有较高抑制作用。其中乙酸乙酯提取物对樟子松枯梢病菌菌丝生长的抑制效果最高,达到 73.20%,乙酸乙酯提取物、超声波提取物、正丁醇提取物对病原菌孢子萌发抑制率均超过 90%。黄敬林等(2004)对樟子松苗木枯梢病进行药剂防治试验表明,75% 百菌清、65% 代森锌、70% 甲基托布津、50% 多菌灵、50% 退菌特、65% 敌克松、乙磷铝等稀释液对樟子松枯梢病菌均有很好的抑制效果,7 种药剂对病原菌孢子的抑制效果均接近或达到 100%,75% 百菌清对病原菌菌丝生长的抑制效果最高,抑菌率为 82%,其次为 50% 多菌灵,抑菌率为 61%,其他药剂对菌丝的抑菌率均低于 60% [7]。虽然本研究获得的炭团菌液体培养菌液乙酸乙酯提取物对樟子松枯梢病菌生长及繁殖的抑制效果略低于化学药剂,但是作为生物制剂,炭团菌液体培养菌液乙酸乙酯提取物具有高效、安全、无污染的特点,在外界自然环境下具有很高的稳定性,并且具有一定的抗氧化还原能力和良好的耐热性,长期贮存不影响其抑菌活性。因此,在绿色生物农药方面显示着巨大的开发潜力。

目前,有关炭团菌属的研究主要集中在两方面,一是由炭团菌引起的病害 [8、9],二是对该属内几种海洋真菌代谢产物的研究 [20-22]。有关炭团菌液体培养菌液提取物对樟子松枯梢病菌的抑菌活性及稳定性研究尚属首次报道。

炭团菌液体培养菌液发酵液乙酸乙酯提取物中有 3 个组分,组分 I 的抑菌率最高(72.94%)。组分 I 含 3 种化合物,其一为得率最高(57.952%)的对

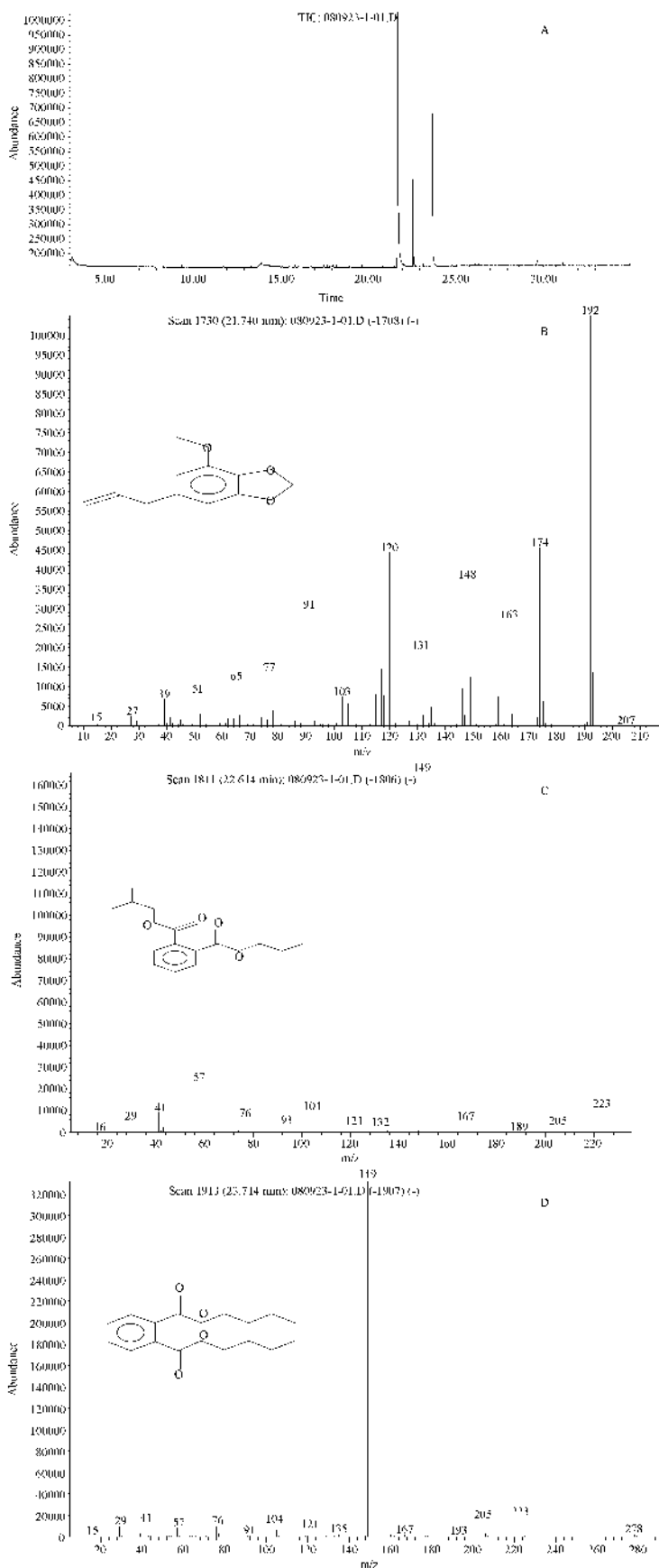


图 6 GC 色谱图及结构式

Fig.6 GC chromatogram and structure. A: component 1; B: component 1; C: component 2; D: compound 3.

甲氧基肉桂酸甲酯,其他两个化合物分别为邻苯二甲酸二异丁酯和邻苯二甲酸二丁酯。对甲氧基肉桂酸甲酯作为医药中间体主要用于化妆品中,作紫外防护吸收剂。未见文献报道对甲氧基肉桂酸甲酯天然存在,一般由对甲氧基肉桂酸与甲醇酯化而得^[23-24]。本研究首次发现对甲氧基肉桂酸甲酯天然存在于炭团菌液体培养菌液中,该发现对于医药工业有着极为重要的意义。

邻苯二甲酸二丁酯是聚氯乙烯最常用的增塑剂,可使制品具有良好的柔软性,还是硝基纤维素的优良增塑剂,凝胶化能力强,用于硝基纤维素涂料,有良好的软化作用。稳定性、耐挠曲性、黏结性和防水性均优于其他增塑剂。也可用作聚醋酸乙烯、醇酸树脂、硝基纤维素、乙基纤维素及氯丁橡胶、丁腈橡胶的增塑剂^[25]。少量的邻苯二甲酸二丁酯对蓝藻的生长有一定的刺激作用,但随着加入量的增大,藻的生长逐步受到抑制,直至衰亡。藻液中加入少量的邻苯二甲酸二丁酯对鱼腥藻 PCC 7120 的生长产生了影响,延缓了其衰亡^[26]。

邻苯二甲酸二异丁酯可用作聚氯乙烯的增塑剂,还可用作纤维素树脂、乙烯基树脂、丁腈橡胶和氯丁橡胶的增塑剂。邻苯二甲酸二异丁酯与颜料的相容性好,可用于着色薄膜,人造革和塑料制品,还可作为天然橡胶和合成橡胶的软化剂,可提高制品的回弹性。邻苯二甲酸二丁酯作为一般化学分析用试剂,用于气相色谱固定液、溶剂、杀虫剂、增塑剂等^[27-28]。

本研究首次发现邻苯二甲酸二异丁酯和邻苯二甲酸二丁酯天然存在于炭团菌液体培养菌液中,该发现对于化学工业意义重大。

参考文献

- [1] Sutton. The Coelomycetes. *Fungi Imperfecti with Pycnidia Acervuli and Stromata* (Kew), 1980: 120.
- [2] 杨旺. 森林病理学. 北京: 中国林业出版社, 1996: 154 - 156.
- [3] 徐贵军, 宋晓东, 等. 樟子松枯梢病的防治研究. 森林病虫害通讯 (*Forest Pest and Disease*), 2001, 3: 16 - 18.
- [4] 吴小芹. 全球松树枯梢病发生状况与防治策略. 世界林业研究 (*World Forestry Research*), 1999, 12 (4): 16 - 21.
- [5] 李宏印, 刘明国. 樟子松人工固沙林发展现状. 辽宁林业科技 (*Liaoning Forestry Science and Technology*), 2003 (5): 35 - 36.
- [6] 黄敬林, 张立, 等. 樟子松枯梢病研究进展. 东北林业大学学报 (*Journal of Northeast Forestry University*), 2005, 33 (2): 83 - 85.
- [7] 宋晓东. 樟子松枯死的起因与防治初探. 防护林科技 (*Protection Forest Science and Technology*), 1993 (3 增刊): 7 - 9.
- [8] 王志明, 刘国荣, 王永民, 等. 吉林省的松枯梢病. 吉林林业科技 (*Jilin Forestry Science and Technology*), 1997 (6): 44.
- [9] 何秉章, 高玉海, 姜俊清, 等. 樟子松主要病害和防治. 哈尔滨: 黑龙江朝鲜民族出版社, 1993: 13 - 16.
- [10] 宋瑞清, 周秀华. *Trichoderma* spp. 对樟子松枯梢病病原菌的影响. 东北林业大学学报 (*Journal of Northeast Forestry University*), 2004, 32 (4): 29 - 30.
- [11] 祁金玉, 宋瑞清. 毒蘑菇菌株及毒素粗提液对樟子松枯梢病菌生长的影响. 林业科技 (*Forestry Science and Technology*), 2006 (8): 20 - 23.
- [12] 杨建雄. 生物化学与分子生物学实验技术教程. 北京: 科学出版社, 2002.
- [13] 祁金玉. 毒蘑菇菌株及其提取物对樟子松枯梢病病原菌的影响. 中国优秀硕士学位论文全文数据库, 2006.
- [14] 宋瑞清, 冀瑞卿. 四种毒蘑菇菌株及其毒素对杨树烂皮病菌生长的抑制作用. 北京林业大学学报 (*Journal of Beijing Forestry University*), 2005, 27 (2): 88 - 91.
- [15] Song Ruiqing, Ji Ruiqing. Inhibiting effect of 4 toxic mushroom strains and their toxins on *Cytospora chrysosperma* Pers.) Fr. KMITL. *Science Journal*, 2004, 4 (4): 125 - 132.
- [16] Wieland T, Schmidt G, Werth L. Über die Giftstoffe des krollen blattrepppilzes. *Liebigs Annalen der Chemie*, 1952, 577: 215 - 233.
- [17] 黄敬林, 庞丽杰, 李宝年等. 樟子松枯梢病防治技术. 东北林业大学学报 (*Journal of Northeast Forestry University*), 2004, 32 (5): 103 - 105.
- [18] 任玉环, 潘丽梅, 阎明真. 美洲山杨炭团菌溃疡病研究现状. 吉林林学院学报 (*Journal of Jilin Forestry University*), 1995, (11)4: 251 - 256.
- [19] Bier JE, Rowat MH, 徐梅卿. 树皮腐生菌对炭团菌腐烂病影响的进一步研究. 林业实用技术 (*Practical Techniques of Forestry*), 1964, 14: 6 - 7.
- [20] 李厚金, 蓝文健, 林永成. 海洋真菌 *Hypoxyton oceanicum* 对 1,2,3,4-四氢萘的转化及其产物测定. 分析测试学报 (*Journal of Instrumental Analysis*), 2005, 4: 45 - 47.
- [21] 乐长高, 林永成, 姜广策, 等. 海洋炭团菌 *Hypoxyton* sp. 低沸点代谢物的研究. 中国海洋药物 (*Chinese Journal of Marine Drugs*), 1999, 2: 12.

- [2] 李厚金, 林永成, 王立, 等. 南海海洋真菌 *Hypoxyton oceanicum* 的代谢产物. 中山大学学报 (自然科学版) (*Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sun Yatsen*), 2001, 4: 70 - 72.
- [3] 张红, 区国勇. 防晒剂对甲氧基肉桂酸酯类的合成进展. 香料香精化妆品 (*Flavour Fragrance Cosmetics*), 2001, 3: 18 - 22.
- [4] 曾庆友, 曾明荣, 许瑞安. 对甲氧基肉桂酸甲酯的一锅式绿色合成. 合成化学 (*Chinese Journal of Synthetic Chemistry*), 2007, 15 (5): 663 - 66.
- [5] 曹祺风, 宋文生, 朱长春, 等. 邻苯二甲酸二丁酯研究概述中国胶黏剂 (*China Adhesives*), 2007, (10): 47 - 49.
- [6] 汪星, 周明, 廖兴盛, 等. 邻苯二甲酸二丁酯对蓝藻生长的影响. 武汉理工大学学报 (*Journal of Wuhan University of Technology*), 2006, 28 (12): 48 - 51.
- [7] 青岛医院卫生学教研组, 青岛塑料研究所. 增塑剂邻苯二甲酸二异丁酯毒性试验. 青岛大学医学院学报 (*Journal of Qingdao University Medical College*), 1977, (1): 9 - 11.
- [8] 柯昌英. 邻苯二甲酸二异丁酯的酯化合成. 化学世界 (*Chemical World*), 1986 (10): 440 - 442.

Antifungal activities and stability of extracts from culture liquid of *Hypoxyton perforatum* to *Sphaeropsis sapinea*

Ruiqing Song*, Haiyan Gao

(School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract: [Objective] Our research objective is to obtain the active substances from culture liquid of *Hypoxyton perforatum* with inhibitory effect on *Sphaeropsis sapinea* growth and germination. [Methods] Water and ester were used for extracting active substances from culture liquid of *Hypoxyton perforatum*, either by extracting directly from cultural liquid, or extracting under ultrasonic. Growth-inhibiting rate and germination-inhibiting rate were used as the index of antifungal activity. [Results] Five extracts from culture liquid of *Hypoxyton perforatum* showed antifungal activities to *Sphaeropsis sapinea* growth and germination.

[Conclusion] Ethyl acetate-extract from culture liquid of *Hypoxyton perforatum* has a highly antifungal activity to *Sphaeropsis sapinea*, high stability in the natural environment. So it has a highly development of the value and application prospect. The mainly inhibiting active substance is methyl p-methoxy cinnamate, which as medicine intermediate was used in cosmetic to be UV-protection absorbefacient. Diisobutyl phthalate and Dibutyl phthalate are all the common plastic-enhancer for PolyvinylChloride (PVC). It is very important in medicinal industry and chemistry industry to discovering the natural presence of the three compounds.

Keywords: *Hypoxyton perforatum*; extracts; *Sphaeropsis sapinea*; antifungal activity; stability

(本文责编: 张晓丽, 谷志静)