

竹红菌甲素对番茄灰霉病菌的关键抑菌因子

樊炎迪^{**1}, 赵学^{**3}, 吴酬飞², 王冰璇¹, 汪石莹¹,
沈佳¹, 桂鹏¹, 袁静¹, 林海萍^{*1}

(1. 浙江农林大学 浙江省绿色农药 2011 协同创新中心, 浙江 临安 311300; 2. 湖州师范学院 生命科学学院, 浙江 湖州 313000; 3. 山东博锐检验检测有限公司, 山东 淄博 255000)

摘要: 为探究竹黄菌 *Shiraia bambuscola* 代谢产物竹红菌甲素 (HA) 对番茄灰霉病菌 *Botrytis cinerea* 的关键抑菌因子, 依据活性氧淬灭原理, 测定了 HA 的光反应类型; 采用单线态氧 (1O_2) 捕捉法、芬顿试剂法和核黄素光化学反应法, 分析了单线态氧 (1O_2)、羟基自由基 ($\cdot OH$) 和超氧阴离子自由基 (O_2^-) 3 种活性氧浓度与 HA 对番茄灰霉病菌抑制率的相关性。结果表明: HA 是通过光动力作用中的 2 种光反应类型 (Type I 和 Type II) 产生的活性氧对番茄灰霉病菌起到抑制作用, 其中主要以 Type II 为主。 1O_2 、 $\cdot OH$ 和 O_2^- 的浓度与其对番茄灰霉病菌的抑制率均呈极显著的线性正相关, 3 种活性氧均为关键抑菌因子。经回归分析, 获得最优回归模型为: $Y = 0.0559 + 0.8145X_1 + 0.002X_2 + 0.7384X_3$, 其中 Y 为抑制率, X_1 、 X_2 和 X_3 分别为 1O_2 、 $\cdot OH$ 和 O_2^- 的浓度, $R^2 = 0.9619$, 可见三者抑菌能力顺序为 $^1O_2 > O_2^- > \cdot OH$ 。本论文首次提出 HA 抑制番茄灰霉病菌的关键因子, 为 HA 作用机理的研究奠定了基础, 并为其作为光活化农药的开发利用提供了理论依据。

关键词: 竹红菌甲素; 番茄灰霉病菌; 关键抑菌因子; 抑菌作用; 活性氧; 光反应类型

中图分类号: S482.2 文献标志码: A 文章编号: 1008-7303(2019)01-0059-07

Key factors in the antifungal activity of Hypocrellin A against *Botrytis cinerea*

FAN Yandi^{**1}, ZHAO Xue^{**3}, WU Choufei², WANG Bingxuan¹, WANG Shiyang¹,
SHEN Jia¹, GUI Peng¹, YUAN Jing¹, LIN Haiping^{*1}

(1. Collaborative Innovation Center of Zhejiang Green Pesticide, Zhejiang A&F University, Lin'an 311300, Zhejiang Province, China; 2. College of Life Sciences, Huzhou University, Huzhou 313000, Zhejiang Province, China; 3. Shandong Burey Inspection Company Limited, Zibo 255000, Shandong Province, China)

Abstract: The key factors in the antifungal activity of Hypocrellin A (HA), the metabolites of *Shiraia bambuscola*, against the *Botrytis cinerea* were investigated. The type of photoactivity of HA was determined based on the principle of active oxygen quenching. The correlation between the concentration of three reactive oxygen species, including singlet oxygen (1O_2), hydroxyl radical ($\cdot OH$), and the superoxide anion radical (O_2^-), and the inhibition rate of HA against *B. cinerea* was analyzed by

收稿日期: 2018-06-19; 录用日期: 2018-12-03.

基金项目: 国家重点研发计划项目子课题 (2017YFD0201302-04); 浙江省 2011 协同创新中心研究基金项目 (S20150004-2).

作者简介: **樊炎迪, 女, 硕士研究生, E-mail: 931240426@qq.com; **赵学, 并列第一作者, 女, 助理工程师, 主要从事药物检测研究, E-mail: 931240426@qq.com; *林海萍, 通信作者 (Author for correspondence), 女, 教授, 主要从事生物农药研究, E-mail: hplin@zafu.edu.cn

the singlet oxygen capture principle, Fenton reaction, and riboflavin photochemical reaction. Results showed that the antifungal activity of HA against *B. cinerea* resulted from the active oxygen generated by photodynamic action (Type I and Type II). Both types exhibited controlling effects against the growth of *B. cinerea*, but Type II exhibited is more active. The concentration of $^1\text{O}_2$, $\cdot\text{OH}$, and $\text{O}_2\cdot^-$ are positively correlated with the bacteriostatic rates, and those three active oxygen species were the key factors in the antifungal activity. Stepwise regression analysis revealed that $^1\text{O}_2$ is the most critical antifungal factor produced by HA, followed by $\text{O}_2\cdot^-$ and $\cdot\text{OH}$. The optimal regression model was obtained as follows: $Y = 0.0559 + 0.8145X_1 + 0.002X_2 + 0.7384X_3$, in which Y was the inhibition rate, X_1 , X_2 and X_3 were the concentration of $^1\text{O}_2$, $\cdot\text{OH}$ and $\text{O}_2\cdot^-$, respectively, $R^2 = 0.9619$. In this paper, the key factors in the antifungal activity of HA against *B. cinerea* were investigated for the first time, which laid a foundation for the study of the mechanism of HA and provided a theoretical basis for the development and utilization of HA as a photoactivated pesticide.

Keywords: Hypocrellin A; *Botrytis cinerea*; key inhibition factors; inhibition; reactive oxygen specie; photo reaction type

竹红菌素 (Hypocrellin) 是一类能够从竹黄菌 *Shiraia bambuscola* 与竹红菌 *Hypocrella bambusae* 天然子座中提取的具有光动力学活性的萘醌类化合物^[1]。目前, 已经发现的竹红菌素主要有竹红菌甲素 (Hypocrellin A, 简称 HA)、竹红菌乙素 (Hypocrellin B)、竹红菌丙素 (Hypocrellin C) 和竹红菌丁素 (Hypocrellin D), 其中在竹子中发现的竹红菌素中, HA 的含量最高, 达 95% 以上^[2]。对于 HA 光敏作用的研究始于中国, 万象义等^[3]最先从竹红菌素中分离得到 HA, 开启了将其作为光治疗药物的研究历史。HA 主要用作医学上光动力学疗法 (Photodynamic therapy, 简称 PDT) 中的光敏剂^[4], 对皮肤疾病^[5-7]、恶性肿瘤^[8]及艾滋病等^[9]均有较好的光敏治疗效果。光敏剂在光和氧的存在下产生活性氧 (ROS), 并利用其攻击生物体达到损害细胞的目的。光反应类型有 Type I 和 Type II 2 种, 其中在 Type I 中产生的活性氧主要有超氧阴离子自由基 ($\text{O}_2\cdot^-$) 和羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$), Type II 则主要产生单线态氧 ($^1\text{O}_2$)^[10-11]。

目前, 绿色环保的生物农药越来越多地引起了人们的关注和重视。由于 HA 可通过产生活性氧自由基发挥杀虫抑菌作用^[12], 因此可能开发成一种新型、高效、低毒的生物农药。笔者前期的试验结果表明, HA 对 18 种重要农林病原菌均具有明显抑制活性, 其中能够较明显地抑制番茄灰霉病菌 *Botrytis cinerea*, 在 50 mg/L 下抑制率达 65.15%^[13]。在此基础上, 笔者进一步研究了 HA

的光反应类型、活性氧的产量与其对番茄灰霉病菌抑制率的相关性, 进而明确了 HA 抑制番茄灰霉病菌的关键因子, 旨在为研究 HA 的作用机理奠定基础, 并为其应用提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 供试菌株

番茄灰霉病菌 *Botrytis cinerea*, 由浙江农林大学生物农药高效制备技术国家地方联合工程实验室提供。

1.2 试剂

N,N-二甲基-4-亚硝基苯胺, 分析纯, 购自 Sigma 公司; 竹红菌甲素 (HA) 标准品, 纯度 97%, 由上海诗丹德生物技术有限公司提供; 组氨酸、色氨酸、甘露醇、抗坏血酸、核黄素、丙酮、硫酸亚铁铵和双氧水, 分析纯, 购自国药集团。

1.3 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 培养基, 参照文献方法^[14]制备; PD 培养液: PDA 培养基不加琼脂即得。

1.4 试验方法

1.4.1 供试菌株培养 将番茄灰霉病菌菌种接于 PDA 培养基上, 置于 26 °C 恒温培养箱中, 自然光条件下培养 5 d。

1.4.2 光反应类型测定 采用活性氧淬灭法^[15]测定光反应类型。分别向 PDA 培养基中加入甘露醇、抗坏血酸和组氨酸作为 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2\cdot^-$ 和 $^1\text{O}_2$ 的淬灭剂, 采用菌丝生长速率法^[16-17]测定不同处理对番

茄灰霉病菌的抑制率。

分别用无菌水配制 0.1 mol/L 的淬灭剂水溶液和 400 mg/L 的 HA 水溶液, 各取 1 mL 加入到 8 mL 灭菌 PDA 平板中, 混合均匀, 得到含 40 mg/L HA 和 0.01 mol/L 淬灭剂的 HA-淬灭剂-PDA 平板, 作为处理组。以无菌水代替 HA 溶液, 得到含 0.01 mol/L 淬灭剂-PDA 平板, 作为对照组。用无菌打孔器在培养好的番茄灰霉病菌平板同一圆周上取直径为 4 mm 的菌饼, 接入处理组与对照组平板中, 分别置于 26 °C 黑暗和光照度为 12 000 lx 下培养 4 d。以十字交叉法测定培养后的菌落直径, 重复 3 次。计算抑制率^[12], 根据加入不同淬灭剂后抑制率的差异大小判断光反应类型。

1.4.3 活性氧对番茄灰霉病菌的抑制作用测定

1.4.3.1 $^1\text{O}_2$ 的抑制作用测定

1) HA 对番茄灰霉病菌的抑制率测定

用无菌水将 HA 标准品配制成 50、100、200、300 和 400 mg/L 的水溶液, 分别取 1 mL 加入到含有 9 mL 灭菌 PDA 平板中, 混合均匀, 得到 5、10、20、30 和 40 mg/L 的 HA-PDA 平板, 作为处理组; 以无菌水代替 HA 溶液得到的 PDA 平板作为对照组。抑制率测定与计算方法同 1.4.2 节。

2) $^1\text{O}_2$ 浓度测定

参照 Guo 等^[18]的方法并加以改进。分别取 1 mL 质量浓度为 50、100、200、300 和 400 mg/L 的 HA 水溶液、1 mL 0.1 mol/L 的 $^1\text{O}_2$ 淬灭剂组氨酸水溶液和 1 mL 10 mmol/L 的 $^1\text{O}_2$ 捕捉剂 *N,N*-二甲基-4-亚硝基苯胺水溶液, 用去离子水定容至 10 mL, 混合均匀得到处理组样品。以无菌水代替 HA 溶液, 获得对照组样品。将处理组与对照组样品均置于光照度为 12 000 lx 条件下, 26 °C 恒温处理 4 d 后, 稀释到合适浓度, 测定 440 nm 处捕捉剂的吸光度 (A_{440}), 重复 3 次。计算 $^1\text{O}_2$ 的浓度。

3) $^1\text{O}_2$ 浓度与抑制率相关性分析

利用 SPSS 软件对 12 000 lx 光照条件下不同质量浓度 HA 的抑制率与 $^1\text{O}_2$ 浓度进行相关性分析。

1.4.3.2 $\cdot\text{OH}$ 对番茄灰霉病菌的抑制作用测定

1) $\cdot\text{OH}$ 抑制率测定

参考涂欣等^[19]的方法, 由芬顿试剂法反应式: $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \cdot\text{OH} + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}$, 可知产生的 $\cdot\text{OH}$ 浓度与 Fe^{2+} 浓度成正比, 故本研究中产生的 $\cdot\text{OH}$ 浓度按照 Fe^{2+} 浓度计算。选用 $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2$

(SO_4)₂ 为 Fe^{2+} 来源, 分别配制浓度为 1 000、500、100、10 和 5 mmol/L 的 $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ 水溶液和 H_2O_2 水溶液, 用 0.45 μm 滤膜过滤除菌。取 2 种溶液各 3 mL, 加入装有 24 mL 灭菌 PD 培养基的三角瓶中, 迅速取 5 个番茄灰霉病菌菌饼加入其中, 摇匀记为处理组。对照组 24 h 后向三角瓶中加入菌饼, 其他操作同处理组, 由于活性氧自由基歧化速率快, 24 h 后反应体系中已不存在 $\cdot\text{OH}$, 从而消除了活性氧对抑菌作用的影响。将处理组和对照组在 26 °C、150 r/min 下振荡培养 5 d。参照李学梅等^[20]方法, 将不同处理组的发酵液取出, 于 1 000 r/min 条件下, 离心 10 min, 弃去上清液, 取底部菌丝用 95% 乙醇进行脱水处理, 105 °C 烘干至恒重, 称量菌丝干重, 重复 3 次, 计算 $\cdot\text{OH}$ 对番茄灰霉病菌的抑制率。

2) $\cdot\text{OH}$ 浓度与抑制率相关性分析

使用 SPSS 软件对不同浓度的 $\cdot\text{OH}$ 与抑制率进行相关性分析。

1.4.3.3 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 对番茄灰霉病菌的抑制作用测定

1) $\text{O}_2^{\cdot-}$ 抑制率测定

参考周雪莹、李锦全等^[21-22]方法并加以改进。根据核黄素光化学反应原理, 核黄素浓度与 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 浓度成正比, 故本研究中产生 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的浓度按照核黄素浓度计算。分别配制浓度为 5、2.5、1、0.5、0.25 和 0.125 mmol/L 的核黄素溶液, 用 0.45 μm 滤膜过滤。取 3 mL 核黄素溶液加入到装有 27 mL 灭菌 PD 培养液的三角瓶中, 迅速取 5 个番茄灰霉病菌菌饼加入其中, 摇匀记为处理组。对照组为以无菌水替代核黄素溶液, 其他操作同处理组。将处理组和对照组均置于照度 12 000 lx、26 °C、150 r/min 下振荡培养 5 d。后续试验方法同 1.4.3.2 节 (1)。

2) $\text{O}_2^{\cdot-}$ 浓度与抑制率相关性分析

利用 SPSS 软件对不同浓度的 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 与抑制率进行相关性分析。

1.4.3.4 关键抑菌因子确定 在进行了 $^1\text{O}_2$ 、 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 浓度与抑制率相关性分析的基础上, 以 3 种活性氧浓度为自变量, 以抑制率为因变量, 进行逐步回归分析, 以确定最关键抑菌因子。

2 结果与分析

2.1 HA 抑制番茄灰霉病菌中的光反应类型

分别选用甘露醇和抗坏血酸为 Type I 淬灭

剂, 组氨酸为 Type II 淬灭剂, 在光照 (12 000 lx) 和黑暗条件下测定其对番茄灰霉病菌的抑制率, 结果见表 1。

表 1 光照 (12 000 lx) 和黑暗条件下活性氧淬灭剂对 HA 抑制番茄灰霉病菌抑制率的影响

Table 1 Effect of ROS scavengers on inhibition rate of HA against *B. cinerea* under illumination of 12 000 lx and dark

处理 Treatment	抑制率 Inhibition rate/%	
	光照 (12 000 lx) Illumination of 12 000 lx	黑暗 Dark
40 mg/L HA	60.42 ± 6.30 a	10.08 ± 1.56 a
40 mg/L HA 和 0.01 mol/L 甘露醇 40 mg/L HA-0.01 mol/L mannitol	39.85 ± 5.00 b	8.99 ± 2.47 a
40 mg/L HA-0.01 mol/L 抗坏血酸 40 mg/L HA-0.01 mol/L ascorbic acid	38.45 ± 5.91 b	10.01 ± 0.92 a
40 mg/L HA-0.01 mol/L 组氨酸 40 mg/L HA- 0.01 mol/L histidine	32.57 ± 1.91 c	11.91 ± 0.57 a

注: 表中数据为 3 次重复的平均值 ± 标准差, 同列不同小写字母表示不同处理在 0.05 水平下差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: The data in the table are the mean value of 3 repetitions plus or minus standard deviation, and the different letters indicate significant difference at $P < 0.05$ level.

由表 1 数据可以看出, 加入与不加入淬灭剂, 光照条件下 HA 对番茄灰霉病菌的抑制率均明显高于黑暗条件下, 说明光照对 HA 发挥抑菌作用具有重要影响。在光照条件下, 加入淬灭剂后 HA 的抑制率比不加淬灭剂的显著降低, 但在黑暗条件下, 是否加入淬灭剂其抑制率均无显著差异。可见, HA 利用在光照条件下产生的活性氧自由基来抑制番茄灰霉病菌。

对光照条件下各处理组的抑制率进行差异性分析。结果表明, 添加 3 种不同的淬灭剂均能显著降低 HA 对番茄灰霉病菌的抑制率 ($P < 0.05$), 特别是添加组氨酸时, 其抑制率与对照组的差异最大。由于光反应类型 Type I 主要产生 $O_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot OH$, Type II 主要产生 1O_2 , 而抗坏血酸、甘露醇和组氨酸分别为 $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ 和 1O_2 的淬灭剂, 可见, 由 Type I 和 Type II 产生的 3 种主要活性氧 1O_2 、 $\cdot OH$ 与 $O_2^{\cdot-}$ 在 HA 抑制番茄灰霉病菌的过程中均存在, 表明其是通过 Type I 和 Type II 的共同作用来进行抑菌的, 由于组氨酸对抑制率的影响最大, 所以主要的光反应类型是 Type II。但是, 添加甘露醇与抗坏血酸之间的抑制率差异不显著, 因此无法通过淬灭剂的方法确定 $\cdot OH$ 和 $O_2^{\cdot-}$ 对抑菌作用贡献的大小, 需进一步测定与分析每

种活性氧与抑制率的相关性, 并做逐步回归分析, 以明确 3 种活性氧抑菌能力的大小。

2.2 活性氧的抑菌作用

2.2.1 1O_2 的抑菌作用

1) HA 对番茄灰霉病菌的抑制作用及 1O_2 浓度测定结果 (表 2) 表明: 在 12 000 lx 光照度下, 不同质量浓度的 HA 对番茄灰霉病菌均有明显的抑制作用, 且不同质量浓度的抑制率间差异显著 ($P < 0.05$); 同时, 不同条件下 1O_2 的浓度均较高, 且随着 HA 质量浓度的升高, 生成的 1O_2 的浓度均呈显著增加 ($P < 0.05$)。

表 2 12 000 lx 光照度下不同质量浓度 HA 对番茄灰霉病菌的抑制率及 1O_2 浓度

Table 2 Inhibition rate against *B. cinerea* and the concentration of 1O_2 with HA at different concentrations under 12 000 lx illumination

HA 质量浓度 The concentration of HA/(mg/L)	抑制率 Inhibition rate/%	1O_2 浓度 Concentration of 1O_2 /(mmol/L)
40	65.15 a	76.80 a
30	52.69 b	54.56 b
20	44.59 c	47.87 c
10	36.23 d	37.76 d
5	26.43 e	20.07 e

注: 同列不同小写字母表示不同处理在 0.05 水平下差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant differences between different treatments at 0.05 level ($P < 0.05$).

2) 1O_2 浓度与抑制率相关性

对抑制率 (Y) 与 1O_2 浓度 (X) 进行相关性分析的结果见图 1。可见, 1O_2 浓度和其抑制率之间呈极显著的线性正相关, 回归方程为 $Y = 0.703X + 0.117$, $R^2 = 0.986$ 。由此可知, 1O_2 在 HA 抑制番茄灰霉病菌过程中发挥着极显著的作用, 是关键抑菌因子。

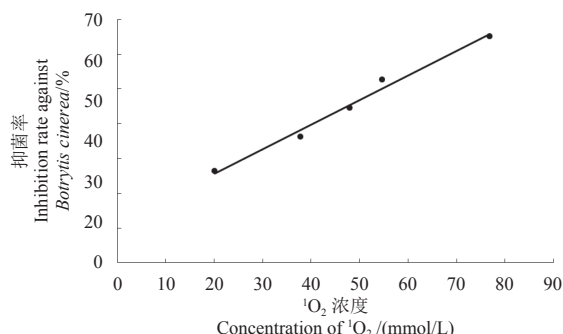


图 1 1O_2 浓度与抑制率的相关性

Fig. 1 Relativity between the concentration of 1O_2 and inhibition rate against *B. cinerea*

2.2.2 $\cdot\text{OH}$ 的抑菌作用

1) $\cdot\text{OH}$ 对番茄灰霉病菌的抑制率

测定结果(表3)表明: 在本试验条件下, $\cdot\text{OH}$ 对番茄灰霉病菌具有明显的抑制效果。除 10.0 和 50.0 mmol/L 下抑制率差异不显著外, 其余均随着 $\cdot\text{OH}$ 浓度的增加, 抑制率显著提高 ($P < 0.05$)。

表3 $\cdot\text{OH}$ 对番茄灰霉病菌的抑制率

Table 3 Inhibition rate of $\cdot\text{OH}$ against *B. cinerea*

$\cdot\text{OH}$ 浓度 The concentration of $\cdot\text{OH}$ /(mmol/L)	抑制率 Inhibition rate/%
100.0	28.67 a
50.0	12.78 b
10.0	11.00 b
1.0	7.70 c
0.5	4.72 d

2) $\cdot\text{OH}$ 浓度与抑制率相关性

对抑制率 (Y) 与 $\cdot\text{OH}$ 浓度 (X) 相关性分析结果(图2)表明: $\cdot\text{OH}$ 的浓度与抑制率之间呈极显著的线性正相关, 回归方程为 $Y = 0.0022X + 0.0548$, $R^2 = 0.9101$ 。表明 $\cdot\text{OH}$ 在抑制番茄灰霉病菌过程中发挥着重要作用, 是抑菌的关键因子。

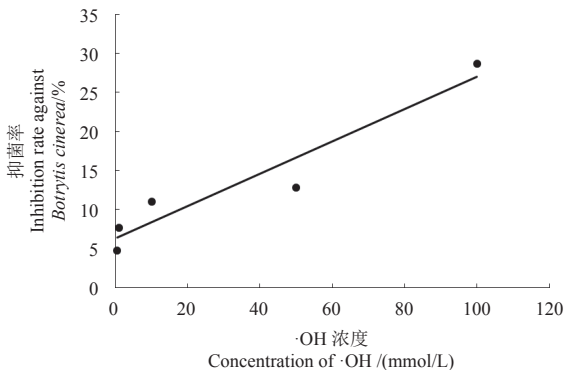


图2 $\cdot\text{OH}$ 浓度与抑制率的相关性

Fig. 2 Relativity between concentration of $\cdot\text{OH}$ and inhibition rate against *B. cinerea*

2.2.3 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的抑菌作用

1) $\text{O}_2^{\cdot-}$ 对番茄灰霉病菌的抑制率

结果(表4)表明: 在本研究条件下, $\text{O}_2^{\cdot-}$ 对番茄灰霉病菌具有明显的抑制作用, 且当 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 浓度大于 0.05 mmol/L 后, 随着 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 浓度的增加, 抑制率显著提高 ($P < 0.05$)。

2) $\text{O}_2^{\cdot-}$ 浓度与抑制率的相关性

相关性分析结果(图3)表明: $\text{O}_2^{\cdot-}$ 浓度 (X) 与

表4 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 对番茄灰霉病菌的抑制率

Table 4 Inhibition rate of $\text{O}_2^{\cdot-}$ against *B. cinerea*

$\text{O}_2^{\cdot-}$ 浓度 The concentration of $\text{O}_2^{\cdot-}$ /(mmol/L)	抑制率 Inhibition rate/%
0.5	38.12 a
0.25	33.57 b
0.1	14.78 c
0.05	4.09 d
0.025	4.44 d
0.0125	4.19 d

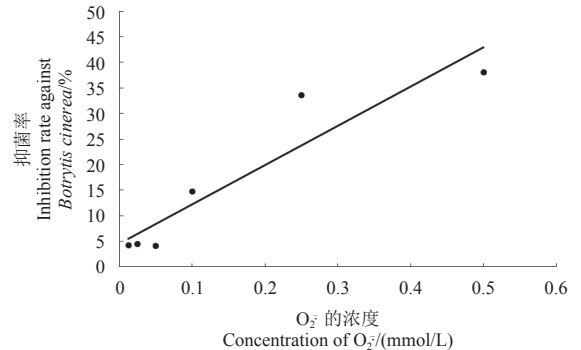


图3 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 浓度与抑制率相关性

Fig. 3 Relativity between concentration of $\text{O}_2^{\cdot-}$ and inhibition rate against *B. cinerea*

抑制率 (Y) 间呈极显著的线性正相关, 回归方程为 $Y = 0.77X + 0.045$, $R^2 = 0.934$ 。可见, $\text{O}_2^{\cdot-}$ 在 HA 抑制番茄灰霉病菌菌丝生长过程中发挥着重要作用, 是抑菌过程中的关键因子。

2.3 关键抑菌因子

在对 $^1\text{O}_2$ 、 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 浓度与抑制率进行相关性分析的基础上, 以 $^1\text{O}_2$ 、 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 3 种活性氧产率作为自变量 X_1 、 X_2 和 X_3 , 抑制率作为因变量 Y , 进行逐步回归分析, 得到最优多元回归模型方程为: $Y = 0.0559 + 0.8145X_1 + 0.002X_2 + 0.7384X_3$ (X_1 为 $^1\text{O}_2$ 浓度, X_2 为 $\cdot\text{OH}$ 浓度, X_3 为 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 浓度), $R^2 = 0.9619$, 得到偏回归系数大小顺序为: $^1\text{O}_2 > \text{O}_2^{\cdot-} > \cdot\text{OH}$ 。可见, 在这 3 种活性氧自由基中, $^1\text{O}_2$ 在抑菌过程中发挥的作用最大, 是 HA 在抑制番茄灰霉病菌菌丝生长过程中最关键的因子。由于光反应类型 Type II 的活性氧产物是 $^1\text{O}_2$, 所以此结果与光反应类型测定结果一致。

3 结论与讨论

竹红菌甲素 (HA) 是一种新型、天然的优良光敏剂, 若将其开发为光活化农药, 不仅可能解决化学农药污染严重、容易产生抗药性等问题, 还

能弥补传统生物农药的不足。这是因为 HA 经光动力作用后可高效防治植物病虫害, 而且作用后能被光分解, 不会残留在环境中造成污染; 光反应产生的活性氧作为抑菌因子攻击生物有机体, 通过破坏生物体细胞结构以达到抑菌的目的, 相对于化学农药来说, 其具有多作用位点, 从而使病虫害对其不易产生抗性。此外, HA 发酵工艺简单, 与其他光敏剂相比, 具有化学组成简单、化学结构确定、来源广泛及高量子产率等优点^[23-24]。因此其具有可能开发为新一代绿色农药的潜力。

本研究中发现, HA 在 50 mg/L 下对番茄灰霉菌最大抑制率可达 65.15% 的基础上, 通过对其在 12 000 lx 光照条件下 HA 抑制番茄灰霉菌过程中 $^1\text{O}_2$ 、 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2\cdot^-$ 3 种活性氧自由基产率与其抑制率之间的相关性分析, 确定了 HA 抑制番茄灰霉菌的关键因子。结果表明, HA 抑制番茄灰霉菌是 Type I 和 Type II 2 种光反应类型共同作用的结果, 且以 Type II 为主。 $^1\text{O}_2$ 为抑菌过程中最关键的因子, 其次是 $\text{O}_2\cdot^-$, $\cdot\text{OH}$ 的作用排在第 3。

已有大量研究结果表明, 光敏剂对肿瘤疾病^[7-8]、皮肤疾病^[4-6]、害虫与菌类^[13, 25]均有明显的光动力抑制作用, 也有不少报道将活性氧量子产率作为衡量光敏剂光氧化效率的标准^[26-28], 但是对光活化农药关键抑菌因子的研究迄今尚未见报道。笔者研究表明, HA 产生的活性氧产率与其对番茄灰霉菌的抑制率呈极显著正相关, 从而确定新型光敏剂 HA 在抑制番茄灰霉菌中的关键抑菌因子为活性氧。根据活性氧的作用机理, HA 在保存过程中应避免光避氧, 并选择晴天喷药, 可提高防治效果。本研究结果可为 HA 的生产应用及其他光活化农药的研发提供借鉴。

参考文献 (Reference):

- [1] 肖仔君, 陈惠音, 杨汝德. 竹红菌素[J]. *中国食品添加剂*, 2003(4): 74-76.
XIAO Z J, CHEN H Y, YANG R D. Hypocrellin[J]. *China Food Additives*, 2003(4): 74-76.
- [2] 乔瑞. 竹红菌素类光动力药物[J]. *阜阳师范学院学报(自然科学版)*, 2009, 26(03): 28-33.
QIAO R. Hypocrellin-based photodynamic sensitizers[J]. *Journal of Fuyang Teachers College(Natural Science)*, 2009, 26(03): 28-33.
- [3] 万象义, 陈远腾. 一种新的光化学疗法药物: 竹红菌素[J]. *科学通报*, 1981, 26(11): 1040-1042.
WAN X Y, CHEN Y T. Hypocrellin A: a new drug for photochemotherapy[J]. *A Mon J Sci*, 1981, 26(11): 1040-1042.
- [4] CHIO-SRICHAN S, OUDRHIRI N, BENNACEUR-GRISCELLI A, et al. Toxicity and phototoxicity of Hypocrellin A on malignant human cell lines, evidence of a synergistic action of photodynamic therapy with imatinib mesylate[J]. *J Photochem Photobiol B*, 2010, 99(2): 100-104.
- [5] JIANG Y, LEUNG A W, WANG X N, et al. Inactivation of *Staphylococcus aureus* by photodynamic action of Hypocrellin B[J]. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2013, 10(4): 600-606.
- [6] 崔荔群. 探讨竹红菌素软膏治疗外阴白斑病的临床价值[J]. *中国卫生标准管理*, 2017, 8(20): 108-109.
CUI L Q. Investigate the clinical value of bamboo mushroom ointment in the treatment of leukoplakia[J]. *China Health Standard Managemt*, 2017, 8(20): 108-109.
- [7] 赵菊芬, 李茜, 杨柳风, 等. 聚焦超声联合竹红菌素软膏治疗外阴白色病变 164 例疗效观察[J]. *中国计划生育和妇产科*, 2012, 4(1): 61-63.
ZHAO J F, LI X, YANG L F, et al. Clinical observation of curative effect on focused-ultrasound combined with hypocrellin-ointment to treat leukoplakia vulvae in 164 cases[J]. *Chin J Family Plann Gynecotokol*, 2012, 4(1): 61-63.
- [8] JIN S, ZHOU L J, GU Z J, et al. A new near infrared photosensitizing nanoplatform containing blue-emitting up-conversion nanoparticles and Hypocrellin A for photodynamic therapy of cancer cells[J]. *Nanoscale*, 2013, 5(23): 11910-11918.
- [9] HUDSON J B, ZHOU J, CHEN J, et al. Hypocrellin, from *Hypocrella bambuase*, is phototoxic to human immunodeficiency virus[J]. *Photochem Photobiol*, 1994, 60(3): 253-255.
- [10] ZHANG Z Y, ZANG L Y, XU G R, et al. Characteristics of the primary reaction of Hypocrellin A photosensitization[J]. *Sci China B*, 1989, 32(9): 1063-1071.
- [11] MAISCH T, BAIER J, FRANZ B, et al. The role of singlet oxygen and oxygen concentration in photodynamic inactivation of bacteria[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(17): 7223-7228.
- [12] 赵学, 李朋举, 朱旭伟, 等. 竹红菌素对番茄灰霉菌的抑制作用[J]. *农药学报*, 2015, 17(2): 149-155.
ZHAO X, LI P J, ZHU X W, et al. Inhibitory effect of Hypocrellin A against *Botrytis cinerea*[J]. *Chin J Pestic Sci*, 2015, 17(2): 149-155.
- [13] 朱齐超, 林海萍, 李朋举, 等. 竹红菌素对 18 种植物病原菌的抑制作用[J]. *植物病理学报*, 2014, 44(1): 107-109.
ZHU Q C, LIN H P, LI P J, et al. Inhibition of Hypocrellin A against 18 pathogenic fungi[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2014, 44(1): 107-109.
- [14] 李平兰, 贺雅非. 食品微生物学实验原理与技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005.
LI P L, HE Z F. Experiments theories and techniques in food microbiology[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2005.
- [15] 赵学. 光活化农药竹红菌素对番茄灰霉菌的关键抑菌因子研究[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2015.

- ZHAO X. Key factors of photoactivated pesticide Hypocrellin A against *Botrytis cinerea*[D]. Hangzhou: Zhejiang A&F University, 2015.
- [16] WHEATLEY R, HACKETT C, BRUCE A, et al. Effect of substrate composition on production of volatile organic compounds from *Trichoderma* spp. inhibitory to wood decay fungi[J]. *Int Biodeterior Biodegrad*, 1997, 39(2-3): 199-205.
- [17] 张凯, 吴曼莉, 辜柳霜, 等. 胶孢炭疽菌生防放线菌gz-8的鉴定及生物活性初步评价[J]. *农药学报*, 2017, 19(6): 708-715.
- ZHANG K, WU M L, GU L S, et al. Identification and preliminary evaluation of a biocontrol actinomycete strain gz-8 against *Colletotrichum gloeosporioides*[J]. *Chin J Pestic Sci*, 2017, 19(6): 708-715.
- [18] GUO X X, YANG X Q, YANG R Y, et al. Salicylic acid and methyl jasmonate but not rose bengal enhance artemisinin production through invoking burst of endogenous singlet oxygen[J]. *Plant Sci*, 2010, 178(4): 390-397.
- [19] 涂欢, 徐涛, 易永, 等. 羟基自由基引起神经细胞[Ca²⁺]_i增高的机制和Ebselen的抑制作用[J]. *生物物理学报*, 1996, 12(3): 522-526.
- TU H, XU T, YI Y, et al. Mechanism of the enhancement effect of hydroxyl radicals on [Ca²⁺]_i in rat cerebral cortical neuronal cells and the inhibition of Ebselen[J]. *Acta Biophysica Sinica*, 1996, 12(3): 522-526.
- [20] 李学梅, 李用芳, 李培睿, 等. 安络小皮伞液体发酵过程中还原糖与pH值、菌丝干重及产量的关系[J]. *中国食用菌*, 2002, 21(2): 37-39.
- LI X M, LI Y F, LI P R, et al. The relations among reducing sugar, pH, dry weight of mycelium and production during the liquid fermentation of *Marasmius androsaceus*[J]. *Ed Fungi China*, 2002, 21(2): 37-39.
- [21] 周雪莹, 熊文, 孔令魁. 核黄素光化学法对血浆中革兰阳性和阴性指示菌的减除作用和对血小板P选择蛋白表达的影响[J]. *中国实验血液学杂志*, 2010, 18(04): 1059-1062.
- ZHOU X Y, XIONG W, KONG L K. Effects of riboflavin combined with photosensitization on reduction of Gram-positive and gram-negative indicating germs in plasma and P-selectin expression of apheresis platelet concentrates[J]. *Journal of Experimental Hematology*, 2010, 18(04): 1059-1062.
- [22] 李锦全, 陈瑞川, 蔡克瑕, 等. 核黄素光化学反应诱导人胃癌细胞凋亡[J]. *癌症*, 2003, 22(3): 253-256.
- LI J Q, CHEN R C, CAI K X, et al. Apoptosis of human gastric cancer cell induced by photochemical riboflavin[J]. *Chin J Cancer*, 2003, 22(3): 253-256.
- [23] 周乃康, 尚立群, 柳曦. 竹红菌乙素-PDT与血卟啉衍生物-PDT对人肺癌细胞杀伤效应的比较研究[J]. *解放军医学杂志*, 2004, 29(12): 1076-1078.
- ZHOU N K, SHANG L Q, LIU X. Comparative study on the killing effect between Hypocrellins B: photodynamic therapy and hematoporphyrin derivative-photodynamic therapy on human lung cancer cells[J]. *Med J Chin PLA*, 2004, 29(12): 1076-1078.
- [24] 尚立群, 周乃康, 顾瑛, 等. 竹红菌乙素-PDT与血卟啉衍生物-PDT对食管癌细胞杀伤效应的比较研究[J]. *肿瘤防治杂志*, 2005, 12(15): 1139-1142.
- SHANG L Q, ZHOU N K, GU Y, et al. Comparative study on killing effect to esophageal cancer cell line between Hypocrellins B: photodynamic therapy and hematoporphyrin derivative-photodynamic therapy[J]. *Chin J Cancer Prev Treat*, 2005, 12(15): 1139-1142.
- [25] 殷红福. 光敏化合物竹红菌素抑菌杀虫作用研究[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2011.
- YIN H F. Research on fungicidal and insecticidal effect of light-activated chemical hypocrellin[D]. Hangzhou: Zhejiang A&F University, 2011.
- [26] HU Y Z, AN J Y, CHIANG L C. Studies on the photoinduced sulfonation of hypocrellins[J]. *J Photochem Photobiol A*, 1993, 70(3): 301-308.
- [27] 夏万林, 张曼华, 蒋丽金. 竹红菌乙素与乙醇胺的作用[J]. *有机化学*, 1992, 12(6): 618-623.
- XIA W L, ZHANG M H, JIANG L J. The reaction between Hypocrellin B ethanolamine[J]. *Chin J Org Chem*, 1992, 12(6): 618-623.
- [28] 李琼瑶, 肖绪玲, 何慧珠, 等. 几种光敏剂光敏氧化效率的比较[J]. *感光科学与光化学*, 1989(2): 59-63.
- LI Q Y, XIAO X L, HE H Z, et al. The comparison of photosensitized oxygenation efficiency for several kinds of sensitizers[J]. *Photograph Sci Photochem*, 1989(2): 59-63.

(责任编辑: 金淑惠)