松蘿酸定量及對植物病原真菌之抑制效果[1]

沈原民[2]、謝煥儒[3]、葉若鋆[4]、劉興隆[2]、洪挺軒[3]

摘　要

松蘿屬地衣普遍含有松蘿酸，此地衣化學物質具有抑制微生物之生物活性。臺灣的松蘿中以*Usnea longissima*的松蘿酸含量最高(3.31%)，其次分別爲*U. fragilescens* (2.05%)、*U. glabrata* (1.99%)、*U. bismolliuscula* (1.95%)。松蘿酸對植物病原菌具有抑制效果，在培養基添加10 ppm 及40 ppm松蘿酸比添加1 ppm更能抑制真菌菌絲生長及孢子發芽，而松蘿酸對不同真菌菌絲生長之抑制率有差異，對*Pestalotia* sp.、*Colletotrichum gloeosporioides*、*Phellinus noxius*的抑制率分別爲71.3%、65.0%、60.9%。實驗結果顯示松蘿酸有潛力應用於植物病害管理。

關鍵字：松蘿、松蘿酸、真菌、地衣、病害管理。

前　言

地衣是真菌與藻類或藍綠菌共生的複合生物，地衣能夠產生許多其他生物無法產生的地衣化學物質，目前已知的地衣化學物質超過800種以上(6)。其中松蘿酸(usnic acid)是一種常見且廣爲研究的地衣化學物質，屬於dibenzofuran的一種，化學式爲2,6-Diacetyl-7,9-dihydroxy-8,9b-dimethyl-1,3(2H,9bH)-dibenzo-furandione; $C_{18}H_{16}O_7$，包括*Usnea*、*Alectoria*、*Cladonia*、*Evernia*、*Lecanora*、*Ramalina*屬地衣都有種類含有松蘿酸。松蘿(*Usnea* sp.)的每個物種都含有松蘿酸，因此瞭解各別物種松蘿酸的含量有助於分類、累積生態學資料及各方面的應用。過去研究指出松蘿酸有多種生物活性，如抗細菌、抗真菌、抗病毒、抗細胞增生、抗昆蟲啃食、毒殺昆蟲等作用(3,4,8)，然而，僅少數報告提及對真菌的影響，並未廣泛地探討植物病原真菌對松蘿酸的反應。本研究的目的在獲得不同物種松蘿之松蘿酸含量，並試圖瞭解松蘿酸對不同種類植物病原真菌的影響，提供應用於農業及植物保護的實驗資料。

[1] 行政院農業委員會臺中區農業改良場研究報告第 0700 號。
[2] 行政院農業委員會臺中區農業改良場助理研究員。
[3] 國立臺灣大學植物病理與微生物學系副教授。
[4] 行政院農業委員會林業試驗所木材纖維組助理研究員。

材料與方法

一、松蘿酸之定量

(一)萃取地衣化學物質

松蘿標本取自臺灣海拔800 m以上的山區，於室溫下陰乾，依形態及化學特徵鑑定到物種層次，並將標本保存於國立自然科學博物館(臺灣，臺中市)。選取包含22個種類的150份松蘿地衣體進行高效液相層析(High performance liquid chromatography, HPLC)，以每10 mg地衣片段加1 ml丙酮(Acros)的比例，於常溫下使用超音波震盪機(Delta)震盪10分鐘，放入25℃生長箱靜置20小時，再以針筒與濾頭將靜置萃取後的溶液過濾到HPLC樣本瓶進行層析。

(二)高效液相層析

HPLC系統(AGILENT)採用逆向層析管柱(C 18; 5 μm; 250 × 4.6 mm; Astec)，設定注射體積20 μl，流速爲0.7 ml/min。而溶劑系統爲1%磷酸(Acros)，及100%甲醇(J. T. Baker)，並依照Feige等人[5]之標準方法設定溶劑於不同時間之比例。選擇波長245 nm作爲光電二極體陣列偵測器(photodiode-array spectrometer)之讀值，針對各別物種的松蘿酸，以積分法計算HPLC層析圖下的面積。

(三)松蘿酸之定量

取松蘿酸(Sigma, 98% (+)-usnic acid)配製成不同濃度作爲標準，可比對出松蘿樣本之松蘿酸含量。將松蘿酸以丙酮溶解，配製成1 mg/ml的溶液，再序列稀釋爲0.1 mg/ml、0.01 mg/ml、0.001 mg/ml共四種濃度，於相同條件下執行HPLC，計算出不同濃度於層析圖下的面積，以Excel軟體(Microsoft)繪製檢量線，得出層析圖下面積與松蘿酸濃度之關係，換算每個松蘿樣本中松蘿酸含量占樣本乾重的百分比。

二、松蘿酸對病原真菌之影響

(一)受試菌株與分析工具

供測試之真菌皆以馬鈴薯葡萄糖培養基(Potato dextrose agar, PDA, Bacto)培養，並作爲實驗處理組之對照。使用之菌株如下：炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*, TDARES 11, 竹塘)、果腐病菌(*Pestalotiopsis psidii*, BCRC 34175, 臺北)、果腐病菌(*Pestalotia* sp., TDARES 12, 芬園)、黑斑病菌(*Alternaria brassicicola*, BCRC 34176, 臺北)、鐮孢菌(*Fusarium* sp., 彰化，分離自菩提樹根部)、疫病菌(*Phytophthora nicotianae*, TDARES 7, 后里)、紋枯病菌(*Rhizoctonia solani* AG1, TDARES 16, 大村)、白絹病菌(*Sclerotium rolfsii*, NTUPPM 35, 臺北)、褐根病菌(*Phellinus noxius*, TDARES 13, 永靖)、角斑病菌(*Pseudocercospora kaki*, TDARES 6, 東勢)、簇葉病菌(*Aciculosporium take*, TDARES 15, 東勢)。菌株分別來自食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心(BCRC)、臺灣大學植物病理與微生物學系(NTUPPM)及臺中區農業改良場植物保護研究室(TDARES)。

實驗資料以Excel及R軟體(R version 2.8.1, R foundation)儲存、統計並製作圖表，參試處理差異以特奇公正顯著差異法(Tukey's honest significance test)，於$\alpha = 0.01$進行多重比較

分析，並以樣本平均數的標準誤差繪製誤差線。

(二)松蘿酸濃度對炭疽病菌菌絲生長之影響

培養炭疽病菌(*C. gloeosporioides*)，比較不同濃度松蘿酸對菌絲生長之影響。處理組以丙酮預先溶解松蘿酸後，加入蒸餾水配製PDA培養基，使最後培養基內之丙酮濃度爲1%，而松蘿酸濃度爲40 ppm、10 ppm、1 ppm，另以PDA與1%丙酮配製之PDA作爲對照組。各處理之培養基經過121℃、15分鐘的高溫高壓滅菌後，製成10 ml的洋菜培養基平板。接種約3 mm^2的*C. gloeosporioides*菌絲塊於上述平板的中央，每種處理接種5個培養皿，置於25℃生長箱培養4天，測量菌絲生長之兩個垂直軸線的直徑，將數值平均後即爲菌絲生長直徑。

(三)松蘿酸對孢子發芽之影響

取*C. gloeosporioides*、*P. psidii*、*Pestalotia* sp.、*A. brassicicola*、*Fusarium* sp.的孢子，比較在不同濃度松蘿酸培養基上對孢子發芽的影響。以最終濃度爲1%丙酮且松蘿酸濃度爲40 ppm、10 ppm、1 ppm之PDA培養基爲處理組，PDA與含1%丙酮之PDA作爲對照組。孢子取自已在培養基上產生大量分生孢子的菌落，以無菌水將孢子洗下，加入1 ml孢子液到各處理之洋菜培養基平板上，用無菌玻璃棒將孢子均勻塗布，置於25℃生長箱培養5小時，以光學顯微鏡觀察孢子發芽的狀況，將孢子發芽管長度大於孢子寬度者視爲已發芽，不產生發芽管或發芽管長度小於孢子寬度者視爲未發芽，每種真菌與處理的組合隨機觀察50個孢子，計算孢子發芽率爲：[已發芽孢子數目/(已發芽孢子數目+未發芽孢子數目)] × 100%。

(四)松蘿酸對不同真菌菌絲生長影響

選取10種不同的植物病原菌，培養於含10 ppm松蘿酸之PDA培養基平板，並以PDA爲對照組，接種約3 mm^2的菌絲塊，每種處理接種4個培養皿，置於25℃生長箱培養。於對照組之菌絲生長直徑大於5 cm之後測量菌落兩個垂直軸線的直徑，平均後得出菌絲生長直徑，其中相同菌株的測量時間一致，如果對照菌絲生長直徑未達5 cm則在培養後12天內測量。用下列方式計算松蘿酸對不同病原菌之菌絲生長抑制率：[(對照組菌絲生長直徑–處理組菌絲生長直徑)/對照組菌絲生長直徑] × 100%。

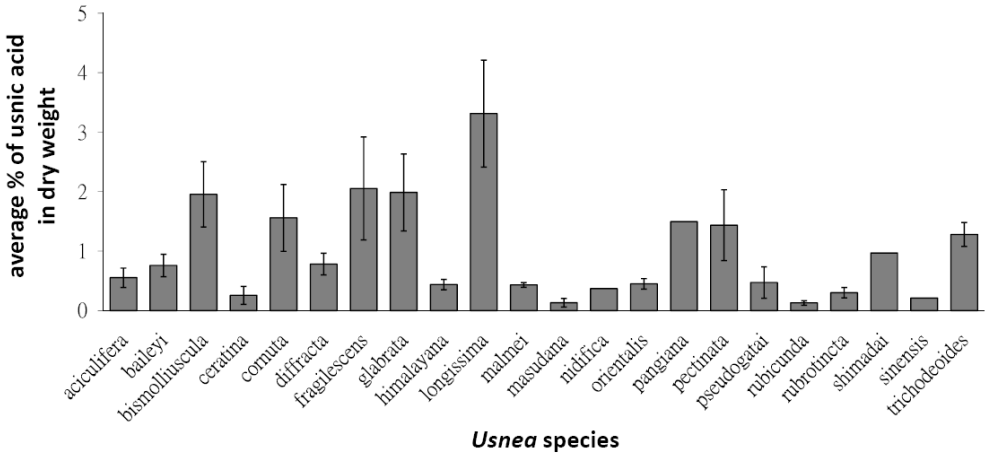
結　果

一、松蘿酸之定量

松蘿酸在本實驗條件下的HPLC滯留時間約30.62分鐘，而松蘿酸具有兩個最大吸收波峰，分別爲235 nm及284 nm。標準品定量中，得到松蘿酸濃度(x)與在245 nm層析圖下面積(y)之關係爲$y = 4026x + 150.98$，$R^2 = 0.9998$。在22個松蘿種類中，所有受測的樣本都含有松蘿酸(圖一)，其中*Usnea longissima*含有最大量的松蘿酸(3.31%)，其次爲*U. fragilescens* (2.05%)、*U. glabrata* (1.99%)、*U. bismolliuscula* (1.95%)。而松蘿酸含量較少的物種是*U. rubicunda* (0.13%)、*U. masudana* (0.13%)、*U. sinensis* (0.21%)、*U. ceratina* (0.26%)。不同物種的松蘿酸含量呈現於圖一。

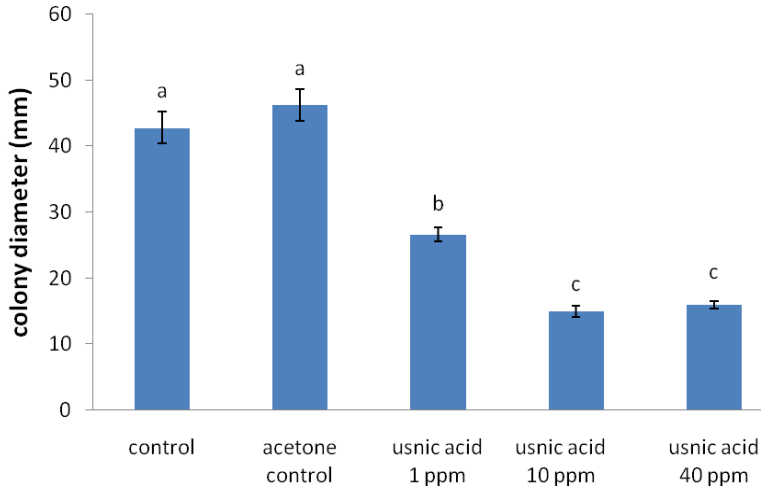
二、松蘿酸濃度對炭疽病菌菌絲生長之影響

各處理之菌絲生長直徑如圖二所示。在培養基中添加松蘿酸使*Colletotrichum gloeosporioides*的菌絲生長受抑制，添加1 ppm、10 ppm、40 ppm的松蘿酸之菌絲生長直徑分別爲26.64 mm、14.94 mm、15.94 mm，比PDA對照組之菌絲生長直徑(42.78 mm)分別低16.14 mm、27.84 mm、26.84 mm。添加1%丙酮不影響*C. gloeosporioides*的生長，而添加10 ppm和40 ppm松蘿酸對菌絲生長抑制的效果，優於添加1 ppm松蘿酸之效果。



圖一、不同松蘿物種之松蘿酸含量。誤差線爲樣本平均數的標準誤差。

Fig. 1. Usnic acid contents in *Usnea* species, including *U. aciculifera* (n=9), *U. baileyi* (n=9), *U. bismolliuscula* (n=8), *U. ceratina* (n=4), *U. cornuta* (n=5), *U. diffracta* (n=5), *U. fragilescens* (n=2), *U. glabrata* (n=2), *U. himalayana* (n=32), *U. longissima* (n=4), *U. malmei* (n=4), *U. masudana* (n=2), *U. nidifica* (n=1), *U. orientalis* (n=16), *U. pangiana* (n=1), *U. pectinata* (n=3), *U. pseudogatai* (n=5), *U. rubicunda* (n=5), *U. rubrotincta* (n=15), *U. shimadai* (n=1), *U. sinensis* (n=1) and *U. trichodeoides* (n=20). Error bars indicate the standard error of the mean.



圖二、松蘿酸濃度對炭疽病菌菌絲生長之影響。

Fig. 2. Effects of concentrations of usnic acid on mycelial growth of *Colletotrichum gloeosporioides*.

三、松蘿酸對孢子發芽之影響

松蘿酸濃度10 ppm及40 ppm對真菌孢子發芽的抑制效果大於濃度爲1 ppm的松蘿酸(表一)。松蘿酸在濃度爲1 ppm時對*Pestalotiopsis psidii*、*Pestalotia* sp.、*Alternaria brassicicola*、*Fusarium* sp.的孢子發芽不具抑制效果，而1 ppm松蘿酸使*Colletotrichum gloeosporioides*的孢子發芽率降低26~32%。松蘿酸在濃度爲10 ppm與40 ppm時，對五種真菌孢子發芽都具有抑制效果，其中*C. gloeosporioides*在10 ppm與40 ppm松蘿酸處理下，五個小時內所有觀察到的孢子都沒有發芽。

表一、不同松蘿酸濃度對五種真菌孢子發芽之影響
Table 1. Spores germination rates of five fungal species in various concentrations of usnic acid

Fungal species	Spores germination rates[1] (%)				
	Control		Usnic acid[2]		
	PDA	PDA with 1% acetone	1 ppm	10 ppm	40 ppm
Colletotrichum gloeosporioides	62	56	30	0	0
Pestalotiopsis psidii	92	94	94	40	62
Pestalotia sp.	98	100	94	6	76
Alternaria brassicicola	96	96	96	72	86
Fusarium sp.	100	90	90	38	56

[1] Spores germination rates (%) were calculated when spores were incubated for 5 hours.
[2] Usnic acid was applied with 1 % acetone in potato dextrose agar.

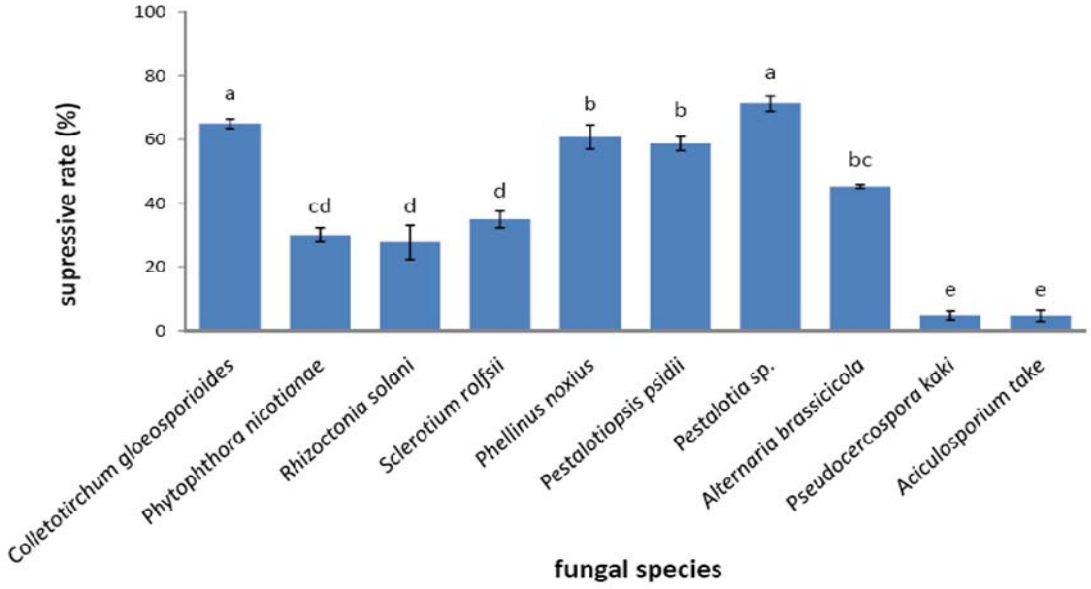
四、松蘿酸對不同真菌菌絲生長影響

十種真菌的平均菌絲生長直徑在添加了松蘿酸的培養基上都低於對照組。其中以對*Pestalotia* sp.與*Colletotrichum gloeosporioides*的菌絲生長抑制率最高，分別達到71.3%及65.0%，其次依序是*Phellinus noxius*、*Pestalotiopsis psidii*、*Alternaria brassicicola*，抑制率分別爲60.9%、58.7%、45.2%。而10 ppm松蘿酸對*Aciculosporium take*與*Pseudocercospora kaki*的影響較小，菌絲生長抑制率分別爲4.7%與4.6% (圖三)。

討　論

本研究爲首次以大量樣本及多種松蘿種類進行松蘿酸的定量。22個松蘿種類裡，*Usnea longissima*的松蘿酸含量最高(圖一)，而且*U. longissima*在全球分佈範圍廣、生物量也比其他松蘿高，適合作爲活生物體的松蘿酸相關研究代表。Macarno[(9)]以薄層色層分析法(TLC)及光譜學方法，偵測*U. laevis*的松蘿酸的含量爲2.7%。Cansaran[(2)]以類似本研究的HPLC方法，偵測土耳其6種松蘿的松蘿酸含量，含量界於0.22~6.49%，而其中*U. longissima*的含量爲1.12%，數值低於臺灣地區*U. longissima*的松蘿酸含量。然而，不同松蘿酸定量研究中，萃取的地衣體表面積、萃取時間或溫度不同，因此在相互比較時需注意實驗條件的差異。從實驗結果中我們能得知松蘿酸在物種間的差異，但也可能與其他環境因子相關，例如Quihot[(11)]研究南極的

*U. aurantiaco-ater*指出，此物種的松蘿酸含量在一月到五月較高，六月到十二月較低，有季節性變化，在這個例子裡，松蘿酸含量與保護地衣體免於紫外線傷害有關。在臺灣尚未有研究指出環境因子對生物產生松蘿酸的影響，本實驗結果中，即使同一個物種的松蘿酸含量仍有高有低，推測除了生物本身的特性之外，還有其他因素影響松蘿酸含量。



圖三、松蘿酸對不同植物病原菌菌絲生長之影響。
Fig. 3. Effects of usnic acid on mycelial growth of plant pathogenic fungi.

實驗中松蘿酸可抑制植物病原真菌。添加10 ppm與40 ppm松蘿酸的效果大於添加1 ppm的松蘿酸，都能夠在培養條件下抑制*Colletotrichum gloeosporioides*的菌絲生長(圖二)。五種真菌在孢子發芽的實驗結果中有相同的趨勢，添加濃度10 ppm以上的松蘿酸降低了真菌分生孢子的發芽率，除了*Pestalotia* sp.的數值變異較大，其他四種真菌在10 ppm與40 ppm兩種松蘿酸濃度處理下的孢子發芽率相近。實驗中*Pestalotiopsis psidii*、*Pestalotia* sp.、*Alternaria brassicicola*、*Fusarium* sp.的分生孢子爲多細胞，對照組的發芽率都大於90%，添加松蘿酸無法完全抑制孢子發芽；而*C. gloeosporioides*的分生孢子爲單細胞，對照組的發芽率比其他四種真菌的對照組發芽率低，10 ppm以上的松蘿酸在五個小時內完全抑制*C. gloeosporioides*的孢子發芽，直到兩天後才觀察到肉眼可見的菌落，而且菌落數量與生長量低於對照組。

我們觀察到培養基內添加40 ppm松蘿酸，在倒入培養皿冷卻後會在洋菜膠內出現結晶物質，可能有少許松蘿酸析出，而10 ppm處理組則未出現此情形，由於兩種濃度於實驗中都能夠抑制病原真菌，因此10 ppm是比40 ppm適合的松蘿酸操作濃度。

本研究測試多種植物病原菌對松蘿酸的反應，支持過去報告中提到松蘿酸對真菌具有生物活性。文獻中指出*Fusarium moniliforme*、*Penicillium frequentans*、*Verticillium albo-atrum*、*Neurospora crassa*會受松蘿酸的抑制，而*Candida albicans*不受松蘿酸的影響[8,10]。而本實驗添

加10 ppm松蘿酸處理十種真菌，平均菌絲抑制率有四種真菌高於50% (*Pestalotia* sp.、*Colletotrichum gloeosporioides*、*Phellinus noxius*、*Pestalotiopsis psidii*)，四種界於25~50%之間(*Alternaria brassicicola*、*Sclerotium rolfsii*、*Phytophthora nicotianae*、*Rhizoctonia solani*)，有兩種低於5% (*Pseudocercospora kaki*、*Aciculosporium take*)，顯示松蘿酸對不同種類真菌有不同程度的影響。另外，隨著培養時間增加，松蘿酸對*P. nicotianae*的影響越明顯，於接種後六天的菌絲抑制率爲15.3%，第十一天提高到30.1%。目前我們只針對一種松蘿酸的光學異構物(右旋，(+)-usnic acid)進行實驗，但從松蘿酸對細菌之影響的文獻中分析，兩種松蘿酸的異構物對同一種生物是否產生影響的反應相同，而影響的程度可能相同或有差異[8]。

松蘿酸已經使用在化妝品、防曬用品、牙膏、食品添加物等[7]，且中國及南美洲地區將含有松蘿酸的松蘿作爲民族藥物使用[1,9]，未來如果發展在農業大量使用前，仍需注意使用劑量及人體攝入時對健康影響的風險。由本實驗結果中得知松蘿酸在低濃度下對病原真菌具有抑制效果，累積更完備的試驗資料後將有潛力應用於植物病害管理。

誌　　謝

本試驗承蒙本場研究同仁與林業試驗所傅春旭先生之支持，以及植保研究室江美換小姐協助進行實驗，使本研究能順利完成，在此謹致謝意。

參考文獻

1. 李時珍　1596　第三十七卷木部四　本草綱目　南京，中國。
2. Cansaran, D., D. Kahya, E. Yurdakulol and O. Atakol. 2006. Identification and quantitation of usnic acid from the lichen *Usnea* species of Anatolia and antimicrobial activity. Z. Naturforsch. 61: 773-776.
3. Cetin, H., O. Tufan-Cetin, A. O. Turk, T. Tay, M. Candan, A. Yanikoglu and H. Sumbul. 2008. Insecticidal activity of major lichen compounds, (-)- and (+)-usnic acid, against the larvae of house mosquito, *Culex pipiens* L. Parasito. Res. 102:1277-1279.
4. Cocchietto, M., N. Skert, P. L. Nimis and G. Sava. 2002. A review on usnic acid, an interesting natural compound. Naturwissenschaften 89:137-146.
5. Feige, G. B., H. T. Lumbsch, S. Huneck and J. A. Elix. 1993. Identification of lichen substances by a standardized high-performance liquid-chromatographic method. J. Chromatogr. 646: 417-427.
6. Huneck, S. and I. Yoshimura. 1996. Identification of Lichen Substances. pp.493. Springer. Berlin; New York.
7. Huneck, S. 1999. The significance of lichens and their metabolites. Naturwissenschaften 86:559-570.
8. Ingolfsdottir, K. 2002. Molecules of interest: usnic acid. Phytochemistry 61:729-736.

9. Marcano, V., V. Rodriguez-Alcocer and A. M. Mendez. 1999. Occurrence of usnic acid in *Usnea laevis* Nylander (lichenized ascomycetes) from the Venezuelan Andes. J. Ethnopharmacol. 66:343-346.
10. Elix, J. A. and E. Stocker-Worgotter. 2008. Biochemistry and secondary metabolites. p.104-133. In: Nash, T. H. (eds.). Lichen Biology, 2nd edn. Cambridge University Press. New York.
11. Quilhot, W., W. Pena, E. Flores, M. E. Hidalgo, E. Fernandez and G. Lllelighton. 1991. Temporal variation in usnic acid concentration in *Usnea aurantiaco-ater* (Jacq.), Bory. Ser. Cient. INACH. 41: 99-106.

Quantification of Usnic Acid and the Suppressive Effects on Plant Pathogenic Fungi[1]

Yuan-Min Shen[2], Huan-Ju Hsieh[3], Ruo-Yun Yeh[4], Hsing-Lung Liu[2] and Ting-Hsuan Hung[3]

ABSTARCT

Usnic acid is generally found in thalli of the lichen genus *Usnea*. The lichen substance has biological activities of microbial inhibition. Among *Usnea* species in Taiwan, *U. longissima* had the highest usnic acid contents (3.31%), followed by *U. fragilescens* (2.05%), *U. glabrata* (1.99%) and *U. bismolliuscula* (1.95%). Suppressive effects of usnic acid were found against plant pathogens. *In vitro* assays with usnic acid at the doses of 10 ppm and 40 ppm were better than at 1 ppm on reducing mycelial growth and spores germination. The suppressive rates against mycelial growth varied among species. There were 71.3%, 65.0% and 60.9% on *Pestalotia* sp., *Colletotrichum gloeosporioides* and *Phellinus noxius*, respectively. The results indicate the potential to apply usnic acid in plant disease management.

Key words: *Usnea*, usnic acid, fungi, lichens, disease management.

---

[1]Contribution No. 0700 from Taichung DARES, COA.

[2]Assistant Plant Pathologist of Crop Environmental Division, Taichung DARES, COA.

[3]Associate Professor of Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University.

[4]Assistant Researcher of Division of Wood cellulose, Taiwan Forestry Research Institute.