

研究报告

香芹酚和丁香酚对腐皮镰刀菌的抑菌活性及抑菌机理

王江来¹, 张锦锋¹, 马金秀¹, 刘璐¹, 沈彤², 田永强^{*1}

1 兰州交通大学生物与制药工程学院, 甘肃 兰州 730070

2 甘肃省植物源生物农药工程技术研究中心, 甘肃 兰州 730070

王江来, 张锦锋, 马金秀, 刘璐, 沈彤, 田永强. 香芹酚和丁香酚对腐皮镰刀菌的抑菌活性及抑菌机理[J]. 微生物学通报, 2022, 49(5): 1638-1650

Wang Jianglai, Zhang Jinfeng, Ma Jinxiu, Liu Lu, Shen Tong, Tian Yongqiang. Antagonistic activity and defense mechanism of carvacrol and eugenol against *Fusarium solani*[J]. Microbiology China, 2022, 49(5): 1638-1650

摘要:【背景】腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)是世界上最具破坏性的土传病原菌之一,严重影响作物的产量及品质。因此寻找并开发广谱的可持续生物防治药剂迫在眉睫,而植物次级代谢物为自然界筛选生物源天然杀菌剂提供了丰富的原料。【目的】研究香芹酚和丁香酚对腐皮镰刀菌的抑菌活性,探究其可能涉及的抑菌机理。【方法】采用菌丝生长速率法、交叉交叉法和孢子萌发法分析香芹酚和丁香酚对菌丝和孢子的抑制活性,通过扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)观察菌丝微观形态的变化,利用荧光染料碘化丙啶(propidium iodide, PI)观察细胞膜的损伤情况,并测定其对腐皮镰刀菌细胞膜胞外电导率、蛋白质含量和麦角固醇合成的影响。【结果】香芹酚和丁香酚对腐皮镰刀菌菌丝生长和孢子萌发均有显著的抑制效果,并呈现剂量依赖效应,EC₅₀值分别为 92.39 μL/L 和 263.00 μL/L。SEM 结果表明,2种精油处理腐皮镰刀菌后,其细胞壁和细胞膜均遭到破坏从而不能维持菌丝正常的线性形态,表现出不同程度的弯曲、褶皱和凹陷。PI染色结果发现,2种精油处理严重破坏了腐皮镰刀菌细胞膜的完整性和通透性,导致胞浆流失、胞外电导率和蛋白质含量急剧增加。高浓度的香芹酚(400 μL/L)和丁香酚(800 μL/L)处理菌体 48 h 后,腐皮镰刀菌中麦角固醇含量分别降低了 78.61%和 67.73%。【结论】香芹酚和丁香酚能抑制腐皮镰刀菌菌丝生长和孢子萌发,破坏腐皮镰刀菌细胞膜的完整性和通透性,干扰细胞膜上麦角固醇的合成来发挥其抗菌功效。本研究为腐皮镰刀菌生物防治药剂的筛选提供了理论基础。

关键词: 香芹酚; 丁香酚; 腐皮镰刀菌

基金项目: 国家自然科学基金(21967015); 甘肃省科技重点研发项目(20YF3FA038); 嘉峪关市科技重大专项(20-04); 兰州交通大学青年基金(2021038)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (21967015); Key Science and Technology Research and Development Project of Gansu Province (20YF3FA038); Jiayuguan Major Science and Technology Project (20-04); Youth Fund of Lanzhou Jiaotong University (2021038)

*Corresponding author: E-mail: tianyq@mail.lzjtu.cn

Received: 2021-09-07; Accepted: 2021-11-02; Published online: 2022-01-09

Antagonistic activity and defense mechanism of carvacrol and eugenol against *Fusarium solani*

WANG Jianglai¹, ZHANG Jinfeng¹, MA Jinxiu¹, LIU Lu¹, SHEN Tong²,
TIAN Yongqiang^{*1}

1 School of Biological and Pharmaceutical Engineering, Lanzhou Jiaotong University, Lanzhou 730070, Gansu, China

2 Biopesticide Engineering Technology Research Center of Gansu Province, Lanzhou 730070, Gansu, China

Abstract: [Background] *Fusarium solani*, one of the most destructive soil-borne pathogens worldwide, seriously affects the yield and quality of crops. Therefore, it is urgent to develop broad-spectrum sustainable biocontrol agents and the abundant secondary metabolites of plants are natural sources. [Objective] To explore the activity of carvacrol and eugenol against *F. solani* and the possible underlying mechanism. [Methods] With the mycelium growth rate method, crossing method, and spore germination method, the inhibitory effect of carvacrol and eugenol on mycelium growth and spore germination of *F. solani* was analyzed. The scanning electron microscope (SEM) was used for observing the mycelial morphology of *F. solani*, and propidium iodide (PI) staining was used for observing the damage to *F. solani* cell membrane. Moreover, the extracellular conductivity, protein content, and ergosterol biosynthesis were analyzed. [Results] Carvacrol and eugenol significantly suppressed the mycelial growth and spore germination of *F. solani* in a dose-dependent manner with the median effective concentration (EC_{50}) values of 92.39 $\mu\text{L/L}$ and 263.00 $\mu\text{L/L}$, respectively. According to the observation under SEM, the cell wall and cell membrane of *F. solani* were damaged after exposed to carvacrol and eugenol. As a result, the mycelia had bends, folds, and depressions rather than the normal linear morphology. PI staining revealed that two essential oils broke *F. solani* cell membrane and enhanced the membrane permeability, resulting in the outflow of cytoplasmic contents and the surge in extracellular conductivity and protein content. After treatment with high concentration of carvacrol (400 $\mu\text{L/L}$) and eugenol (800 $\mu\text{L/L}$) for 48 h, the ergosterol content in *F. solani* decreased by 78.61% and 67.73%, respectively. [Conclusion] Carvacrol and eugenol inhibit the mycelial growth and spore germination of *F. solani*, damage the cell membrane, enhance membrane permeability, and disrupt the ergosterol biosynthesis on cell membrane, thereby exerting the antifungal activity. In conclusion, this study lays a theoretical basis for the screening of biocontrol agents of *F. solani*.

Keywords: carvacrol; eugenol; *Fusarium solani*

腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)是一种世界性广泛分布的丝状致病真菌,是引起农作物土传病害的主要致病菌之一。其厚垣孢子可以在土壤中存活多年,当萌发条件合适时通过微小伤口侵染多种粮食作物、经济作物、药用植物及观赏植物的维管束,引起一系列植物腐烂病

害,如根腐、茎腐、穗腐、茎基腐和花腐等,严重影响农作物产量和品质,是农业生产过程中最难防治的病原菌之一^[1-4]。目前,主要依靠轮作结合化学杀菌剂(如多菌灵、恶霉灵等)预防或治疗由腐皮镰刀菌引起的植物病害,但长期使用化学合成杀菌剂会导致环境污染、病

原菌耐药性增强并具有潜在的食品安全风险等一系列问题,不符合现代农业可持续发展的需要,因此亟待开发一种绿色环保且高效广谱的生物杀菌剂防治腐皮镰刀菌引起的土传病害。

植物精油(plant essential oil, EO)是植物天然的次级代谢产物,因其广谱的抗菌活性已受到国内外大量天然药物研究者的青睐^[5-7]。香芹酚和丁香酚分别是牛至精油和丁香精油的主要成分,据报道能抑制多种病原微生物的生长,包括革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌、镰刀菌属及链格孢菌属^[8-11],已广泛应用于食品、医药和化妆品行业。目前,植物精油抗植物病原微生物活性的潜在机制尚不明确。许多研究发现,经植物精油处理后的植物病原菌细胞壁会变得异常薄弱,细胞膜完整性受到损伤,细胞膜通透性显著增加,导致细胞内离子、核酸和蛋白质等胞内物释放^[12]。Gonçalves 等^[13]发现牛至精油及香芹酚能降低由尖孢镰刀菌引起的番茄枯萎病发病率和严重程度,对尖孢镰刀菌的最小抑菌浓度分别为 125 $\mu\text{g/mL}$ 和 400 $\mu\text{g/mL}$ ^[14]。戴雨芸等^[15]发现,香芹酚通过抑制生物被膜合成相关基因 *icaA*、*cidA* 和 *sarA* 的转录水平和细胞间多糖黏附素的合成等关键途径从而达到抗金黄色葡萄球菌的功效。Ju 等^[16]发现丁香酚能够阻止黑曲霉生长,可以作为一种有效的防腐剂延长面包的保质期,通过扫描电镜和荧光显微镜发现黑曲霉菌丝发生明显的形态变化和细胞膜破裂现象,其胞外电导率升高、胞内蛋白质和核酸泄露也证实了细胞膜的破裂。Wei 等^[17]利用 RT-qPCR 技术证明,肉桂醛能够显著下调接骨木镰刀菌中对麦角固醇生物合成起关键调控作用基因的表达水平,从而证实了麦角固醇是精油抗菌过程中的关键靶标。

现阶段国内外有关香芹酚和丁香酚拮抗植物病原菌腐皮镰刀菌的研究较少,相关抑菌机

制也未见报道。因此,本文以土传病害腐皮镰刀菌为研究对象,开展香芹酚和丁香酚的抑菌活性和抑菌机制研究,以期为更好地开发利用香芹酚和丁香酚提供理论依据,为土传病害致病菌的防控提供新型绿色环保的生物源农药。

1 材料与方法

1.1 致病真菌

腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)由甘肃农业大学植物保护学院提供,用 15%的甘油保藏于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中,以供后续使用。

1.2 主要试剂和仪器

香芹酚(纯度>99%)、丁香酚(纯度>99%),上海阿拉丁生化科技股份有限公司;碘化丙啶,生工生物工程(上海)股份有限公司;无水乙醇、琼脂、葡萄糖、十二水合磷酸氢二钠、二水合磷酸二氢钠均为国产分析纯。

扫描电子显微镜,卡尔蔡司(上海)管理有限公司;荧光显微镜,浙江宁波永新光学股份有限公司;电导仪,上海仪电科学仪器股份有限公司;紫外可见分光光度计,上海美谱达仪器有限公司;酶标仪,深圳容金科技有限公司。

1.3 香芹酚和丁香酚对腐皮镰刀菌抑菌活性测定

采用菌丝生长速率法、十字交叉法和半数有效浓度法(median effective concentration, EC_{50})检测香芹酚和丁香酚对腐皮镰刀菌的抑菌效果。用直径 8 mm 的无菌打孔器在培养 7 d 后的腐皮镰刀菌菌落边缘处打取菌饼备用。用二甲基亚砜将香芹酚和丁香酚分别配制成浓度为 100 $\mu\text{L/L}$ 的母液,用孔径 0.22 μm 的无菌滤膜过滤除菌。取不同体积母液和 20 mL 已灭菌 PDA 培养基混匀制成系列浓度的含精油平板(表 1),以不加精油的 PDA 平板为对照。待平板冷凝后,将菌饼反接于含药平板中央,然后

表 1 供试精油浓度

Table 1 Concentration of essential oils tested

精油	浓度						
Essential oil	Concentration ($\mu\text{L/L}$)						
香芹酚 Carvacrol	0	40	60	80	100	150	200
丁香酚 Eugenol	0	150	200	250	300	350	400

倒置培养于 28 °C 恒温培养箱中, 待对照组菌落长满平板 2/3 处后, 通过十字交叉法测量各处理菌落直径, 计算菌丝生长抑制率。每个浓度处理重复 3 次。根据生物统计法对病原菌生长抑制率与精油浓度进行毒力分析, 以各处理组精油浓度作对数为 x 轴、菌丝生长抑制率为 y 轴进行回归分析, 求出毒力回归曲线方程、相关系数 R^2 和 EC_{50} 。

1.4 香芹酚和丁香酚对腐皮镰刀菌孢子萌发的影响

将 10 mL 无菌水注入已培养 7 d 的腐皮镰刀菌 PDA 平板中, 用无菌接种针轻轻刮取菌丝表面, 制备孢子悬浮液, 用无菌水调整浓度为 2×10^6 个/mL。在 1 mL 孢子悬浮液中添加不同体积的香芹酚使其终浓度分别为 0、40、80、120、160 $\mu\text{L/L}$, 混合均匀后取 100 μL 滴加在凹玻片中央。将凹玻片放置在含有湿滤纸的无菌培养皿中置于 28 °C 培养箱中培养。10 h 后进行显微观察, 以芽管长于孢子直径一半视为萌发, 统计孢子萌发数。丁香酚处理组 (0、50、80、110、140 $\mu\text{L/L}$) 重复上述操作。每处理重复 3 次, 每重复镜检 3 个视野, 每次镜检超 100 个孢子, 计算孢子萌发率和萌发抑制率。孢子萌发率 (%) = 萌发孢子数 / 镜检总孢子数 $\times 100$;
萌发抑制率 (%) = (对照孢子萌发率 - 处理孢子萌发率) / 对照孢子萌发率 $\times 100$ 。

1.5 SEM 观察腐皮镰刀菌形态

腐皮镰刀菌分别经 200 $\mu\text{L/L}$ 香芹酚和

400 $\mu\text{L/L}$ 丁香酚处理 2 d 后, 用八层无菌纱布过滤收集菌丝, 用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (PBS, pH 7.2) 冲洗 3 次, 并重新悬浮于 PBS 中备用。以不加精油但相同处理的样品为对照组。按照 Yu 等^[18]的方法制样, 样品固定后通过真空冷冻干燥机干燥, 离子溅射镀膜机镀膜 120 s, 所有样品均在 SEM 下观察并拍照。

1.6 PI 染色

通过 PI 荧光染料可视化 2 种精油对腐皮镰刀菌细胞膜的破坏程度。从活化 7 d 的腐皮镰刀菌平板边缘打取菌饼 (直径 8 mm), 接种到含有不同有效浓度的精油 (香芹酚: 80、200、400 $\mu\text{L/L}$; 丁香酚: 200、400、800 $\mu\text{L/L}$) PDB 培养基中, 28 °C、180 r/min 共培养 12 h, 5 000 $\times g$ 、4 °C 离心 5 min 收集菌丝体, PBS 洗涤 3 次, 并将菌丝体重悬于 5 mL PBS 中。样品中加入 10 $\mu\text{g/mL}$ PI 染色, 30 °C 黑暗环境下孵育 20 min。染色完毕后, PBS 漂洗样品 3 次, 以去除残留的染料。最后利用荧光显微镜 (546 nm 激发波长和 590 nm 发射波长) 观察样品, 重复 3 次, 每次随机观察 3 个视野。以不加精油作空白对照组。

1.7 胞外相对电导率和蛋白质含量的测定

通过测定胞外电导率和上清液中蛋白质含量的变化来评估经精油处理后腐皮镰刀菌细胞膜通透性的损伤程度。按 1.6 获得的菌饼接种于 PDB 培养基, 28 °C、180 r/min 培养 2 d 后用八层无菌纱布过滤获取菌丝, 并用 PBS 洗涤 3 次以去除残余培养基, 然后将 0.5 g 菌丝置于含不同精油浓度的无菌水中。利用电导仪在不同时间点 (0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 h) 测量电导率, 并在 4 h 后将菌丝沸水浴处理 15 min 后测定最终电导率, 计算出各个时间点的相对电导率值。胞外蛋白质含量的测定如上所述, 在处理期间每 1 h 取 5 mL 上清液用于胞外蛋白

含量测定。蛋白质定量利用考马斯亮蓝法以牛血清蛋白做标准曲线评估。上述实验独立重复3次。

1.8 细胞膜上麦角固醇含量的测定

采用 Tian 等^[19]所述方法,测定2种精油分别对病菌细胞膜上麦角固醇含量的影响。按1.5方法获得的菌丝体,用无菌水洗涤2次,并记录菌丝净湿重。接着在85℃条件下加入5 mL新鲜制备的25% (质量体积分数)乙醇/KOH混合液皂化菌体4 h。皂化完毕冷却至室温,加入5 mL正庚烷用于提取固醇,剧烈涡旋15 min,并于室温静置分层1 h。上层混合物用于紫外分光光度计检测(每个处理组重复3次)。麦角固醇和固醇中间体24(28)脱氢麦角固醇在230 nm和282 nm处会生成特征吸收曲线,按以下方程式计算麦角固醇含量:

麦角固醇(%)= $A_{282}/(290 \times \text{菌丝湿重}) - A_{230}/(518 \times \text{菌丝湿重})$ 。

1.9 数据分析

每组实验至少重复3次,每次重复设置3个平行,实验数据均以“平均值±标准偏差”表示。采用Microsoft Excel软件计算各种精油对腐皮镰刀菌的菌丝抑制率和孢子萌发抑制率;利用SPSS 26.0软件进行统计分析;采用单因素方差分析,并用Duncan's法和独立样本t检验进行数据比较, $P < 0.05$ 表示试验样本之间存在显著性差异。

2 结果与分析

2.1 不同浓度香芹酚和丁香酚对腐皮镰刀菌菌丝生长的抑制作用

不同浓度的香芹酚和丁香酚对腐皮镰刀菌菌丝生长的抑制效果见表2,2种植物精油均能显著地抑制腐皮镰刀菌菌丝的生长($P < 0.05$),并且生长抑制率与药剂浓度成正比。当精油浓度为200 μL/L时,香芹酚能完全抑制腐皮镰刀菌

表2 香芹酚和丁香酚对腐皮镰刀菌的抑制效果

Table 2 Inhibitory effects of carvacrol and eugenol on *Fusarium solani*

精油	浓度	菌落直径	抑制率	毒力方程	半数有效浓度	相关系数
Essential oil	Concentration	Colony diameter (cm)	Inhibition rate (%)	Virulence equation	EC_{50} (μL/L)	R^2
	(μL/L)					
香芹酚 Carvacrol	0	7.55±0.05a	0.00g	$y=4.69x-9.31$	92.39	0.969
	40	7.42±0.03b	1.77f			
	60	5.53±0.10c	26.71e			
	80	4.40±0.13d	41.72d			
	100	3.57±0.03e	52.76c			
	150	2.60±0.05f	77.26b			
丁香酚 Eugenol	0	7.08±0.08a	0.00g	$y=1.84x-4.47$	263.00	0.948
	150	5.25±0.23b	25.88f			
	200	4.33±0.42c	38.92e			
	250	3.60±0.10d	49.18d			
	300	3.03±0.57e	57.18c			
	350	2.70±0.20f	61.88b			
	400	0.00±0.00g	100.00a			

注:不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)

Note: Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

菌丝生长, 而丁香酚抑制率仅为 38.92%。这表明在同等条件下, 香芹酚对菌丝生长的抑制效果优于丁香酚。进一步随着丁香酚有效浓度的增加, 抑制率也逐渐增加, 400 $\mu\text{L/L}$ 丁香酚能 100%抑制腐皮镰刀菌菌丝生长。应用 SPSS 软件进行毒力分析, 结果表明香芹酚的抑菌效果比丁香酚显著, EC_{50} 值分别为 92.39 $\mu\text{L/L}$ 和 263.00 $\mu\text{L/L}$ 。通过计算香芹酚和丁香酚对腐皮镰刀菌的毒力回归方程, 发现二者的相关系数均接近于 1, 表明 2 种精油的抑菌效果与精油的有效浓度呈良好的正相关性, 即随着精油有效浓

度的增加, 对病原菌的抑制效果也逐渐增强。

2.2 香芹酚和丁香酚对腐皮镰刀菌孢子萌发的抑制作用

不同浓度的香芹酚和丁香酚均能显著地抑制腐皮镰刀菌的孢子萌发(图 1)。孢子萌发率随 2 种精油浓度升高而逐渐降低。当精油浓度最高(香芹酚 160 $\mu\text{L/L}$ 和丁香酚 140 $\mu\text{L/L}$)时, 腐皮镰刀菌孢子萌发率均最低(1.33%和 5.67%), 而对照组的萌发率分别为 84.34%和 97.33%, 萌发抑制率均达到了 90%以上。经 80 $\mu\text{L/L}$ 的香芹酚和丁香酚处理后, 腐皮镰刀菌的孢子萌发

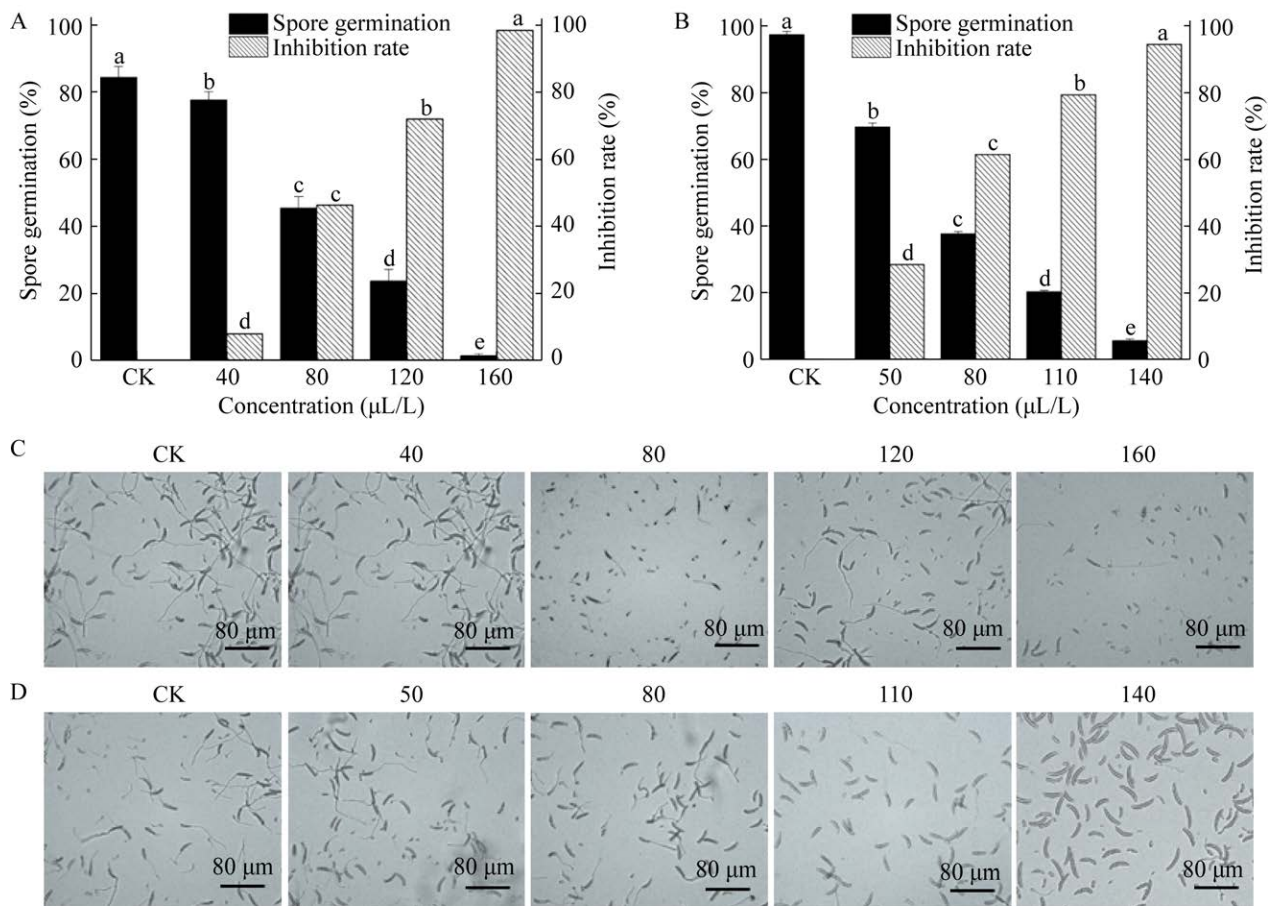


图 1 不同浓度香芹酚和丁香酚对腐皮镰刀菌孢子萌发的抑制作用(A、B)及镜检视野(C、D) (200 \times)
A、C: 香芹酚; B、D: 丁香酚。不同小写字母表示差异显著, 下同

Figure 1 Inhibitory effects of carvacrol and eugenol at different concentration on spore germination of *Fusarium solani* (A, B) and microscopic examinations (C, D) (200 \times). A, C: Carvacrol; B, D: Eugenol. Different lowercase letters indicate significant differences, the same below.

抑制率分别达到了 45.33%和 61.30%，说明在相同浓度下腐皮镰刀菌孢子对丁香酚的敏感性要略高于香芹酚。

2.3 扫描电镜观察腐皮镰刀菌菌丝形态

扫描电镜(SEM)被广泛用于观察细胞的微观形态结构变化。本文利用 SEM 观察香芹酚和丁香酚对腐皮镰刀菌菌丝微观形态的影响(图 2)。结果显示,对照组菌丝饱满、表面规则且具备正常的菌丝生理结构,而腐皮镰刀菌经精油处理后菌丝呈不规则收缩,菌丝表面有明显褶皱、凹陷和干瘪现象,出现了菌丝破裂的碎片。上述结果说明,精油处理使病原菌菌丝形态结构发生不可逆的变形和破坏,导致其正常的生理功能无法维持而死亡。

2.4 香芹酚和丁香酚对腐皮镰刀菌细胞膜完整性的影响

研究结果显示(图 3),PI 染色后对照组菌丝基本无可观测的荧光,而用 80 $\mu\text{L/L}$ 香芹酚和 200 $\mu\text{L/L}$ 丁香酚处理腐皮镰刀菌后有少数菌丝发出零星的红色荧光,当两者浓度分别为 200 $\mu\text{L/L}$ 和 400 $\mu\text{L/L}$ 时,发出红色荧光的菌丝数量增多。表明菌丝细胞膜受药物损伤程度具

有浓度依赖性。当病原菌暴露于高浓度香芹酚(400 $\mu\text{L/L}$)和丁香酚(800 $\mu\text{L/L}$)时,几乎所有菌丝均能激发出明亮的红色荧光,说明菌丝细胞膜完全被破坏。PI 染色图片直观反映出上述 2 种精油处理会破坏腐皮镰刀菌菌丝细胞膜,从而增加细胞膜的通透性,致使胞浆外流,菌体内环境稳态失衡,最终导致菌体死亡。

2.5 香芹酚和丁香酚对腐皮镰刀菌细胞膜通透性的影响

腐皮镰刀菌菌丝胞外电导率的测定结果表明,在香芹酚和丁香酚处理后 0-4 h 内,菌丝胞外电导率均呈上升趋势,并且随着处理浓度增加和时间的延长,电导率大幅度增加,而对对照组的电导率值仅呈现轻微上升(图 4A、4B)。用高浓度精油处理后 0-1.5 h 内,2 个处理组的胞外电导率均急剧增加,之后缓慢增加,其中香芹酚处理组菌丝的胞外电导率值随着处理时间的延长呈线性增加,说明香芹酚处理后腐皮镰刀菌胞内 K^+ 和 Na^+ 释放更显著。此外,当腐皮镰刀菌分别被 2 种精油处理后,上清液中蛋白质含量也表现出与电导率相似的浓度和时间依赖性变化趋势(图 4C、4D),即胞外蛋白质含量与

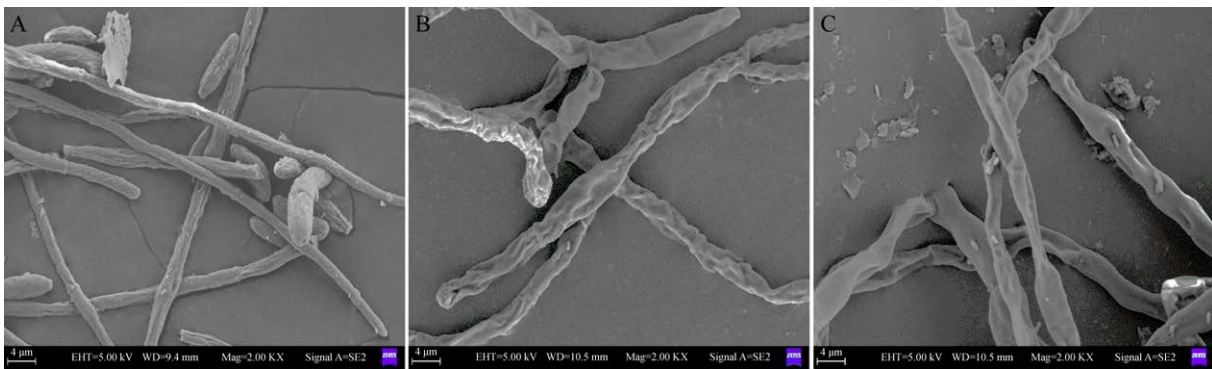


图 2 香芹酚和丁香酚对腐皮镰刀菌菌丝形态的影响 A: 空白对照组; B: 香芹酚处理组; C: 丁香酚处理组

Figure 2 Effects of carvacrol and eugenol on mycelial morphology of *Fusarium solani*. A: Blank control group; B: Carvacrol treatment; C: Eugenol treatment.

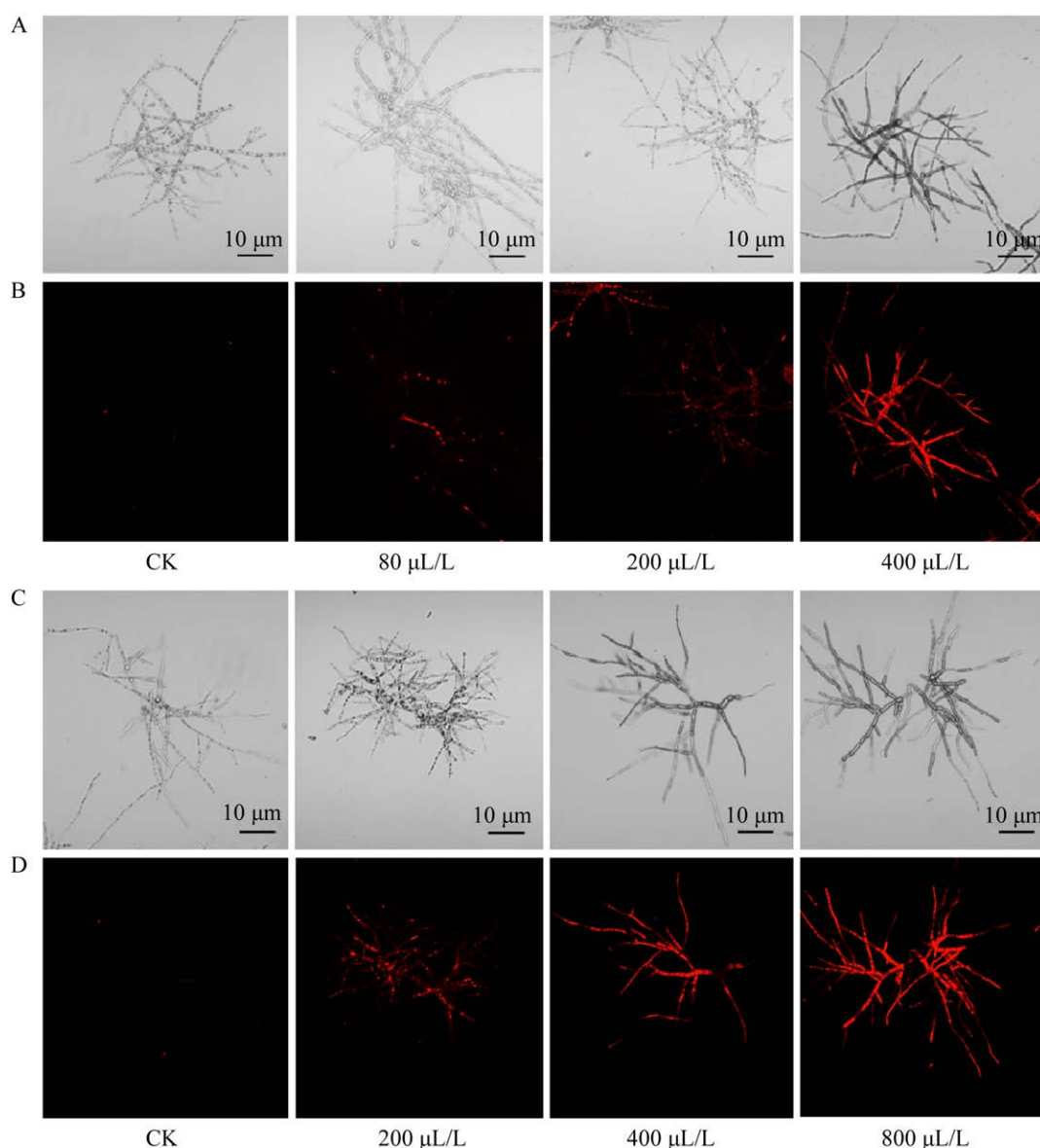


图 3 不同浓度香芹酚和丁香酚对腐皮镰刀菌细胞膜完整性的影响(400×) A、B: 香芹酚处理组光学及荧光拍照; C、D: 丁香酚处理组光学及荧光拍照

Figure 3 Effects of carvacrol and eugenol at different concentration on cell membrane integrity of *Fusarium solani* (400×). A, B: Photographs of light and fluorescence microscopy of carvacrol treatments; C, D: Photographs of light and fluorescence microscopy of eugenol treatments.

处理时间和浓度呈正相关, 各处理组在 1–6 h 之间差异显著($P < 0.05$), 其中香芹酚处理组作用 1 h 后, 上清液蛋白质含量迅速增加, 而丁香酚处理组在前期上升缓慢, 后期快速升高, 说明香芹酚发挥药效更迅速, 破坏作用更强

烈。上述结果表明香芹酚和丁香酚处理均明显提高了菌体内相应离子和蛋白质的泄露程度, 进一步验证了 SEM 观察和 PI 染色的结果, 表明精油处理破坏了菌体细胞膜而造成胞内离子和蛋白成分外泄。

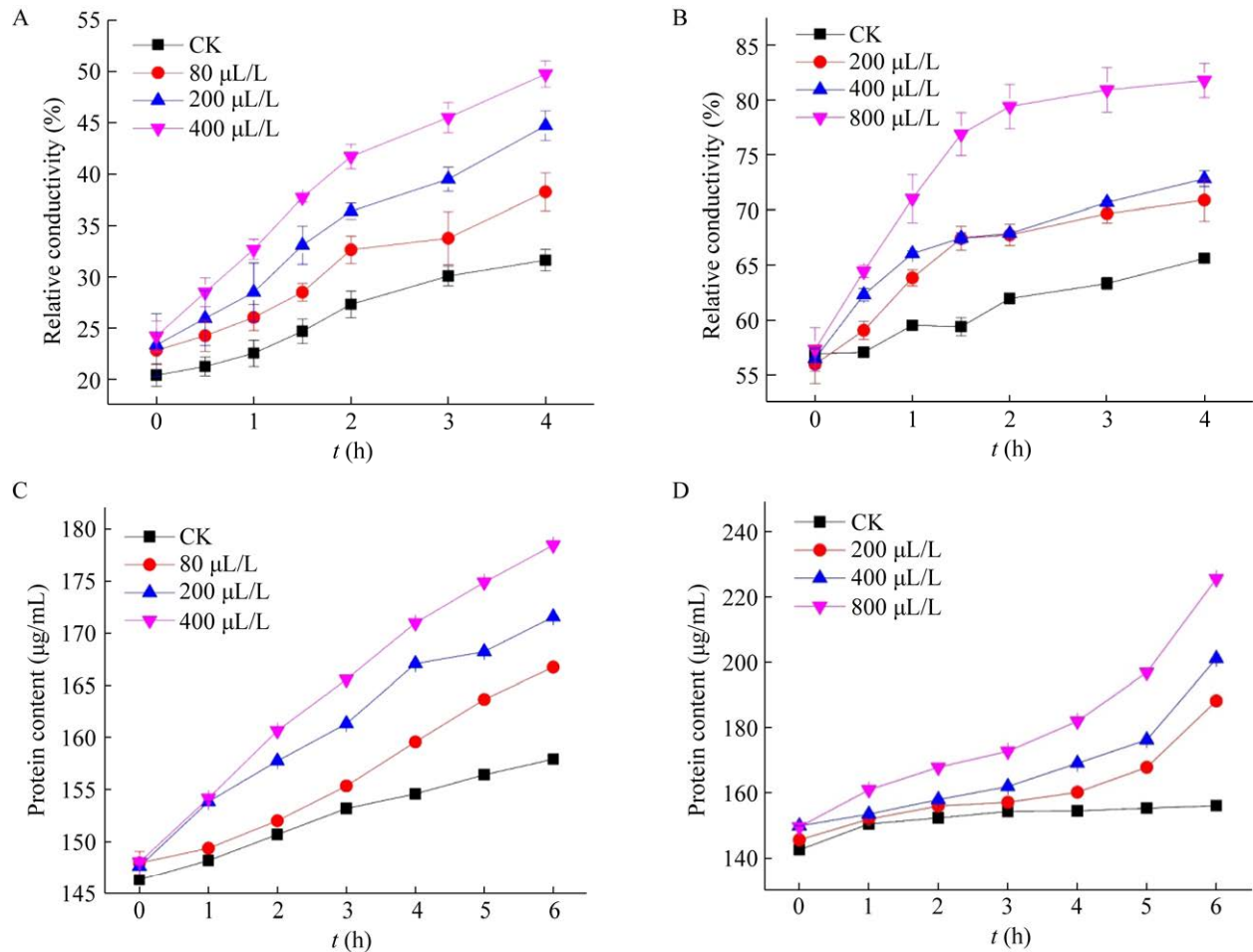


图 4 不同浓度香芹酚和丁香酚对腐皮镰刀菌胞外电导率和蛋白质含量的影响 A: 香芹酚处理组电导率; B: 丁香酚处理组电导率; C: 香芹酚处理组蛋白质含量; D: 丁香酚处理组蛋白质含量

Figure 4 Effects of carvacrol and eugenol at different concentration on the extracellular conductivity and protein content of *Fusarium solani*. A: Conductivity of carvacrol treatment; B: Conductivity of eugenol treatment; C: Protein content of carvacrol treatment; D: Protein content of eugenol treatment.

2.6 香芹酚和丁香酚对麦角固醇合成的影响

通过皂化法评估了香芹酚和丁香酚对腐皮镰刀菌细胞膜麦角固醇含量的影响。结果如图 5 所示, 不同浓度的香芹酚和丁香酚分别与腐皮镰刀菌作用后, 腐皮镰刀菌细胞膜内麦角固醇的含量与对照组相比均显著降低($P < 0.05$), 并且麦角固醇含量与精油浓度呈现剂量依赖性。最高浓度的香芹酚(400 $\mu\text{L/L}$)和丁香酚(800 $\mu\text{L/L}$)处理使菌体麦角固醇含量相对对照组分别降低

了 78.61%和 67.73%。说明香芹酚和丁香酚处理能够有效地抑制菌体麦角固醇的合成, 并且香芹酚对麦角固醇合成的抑制作用比丁香酚更强, 不同处理浓度间存在显著差异($P < 0.05$)。

3 讨论与结论

已有研究表明, 多种牛至属和丁香属植物提取物对植物病原菌具有较好的抑制作用。0.1%牛至精油和丁香精油均能 100%抑制意大利

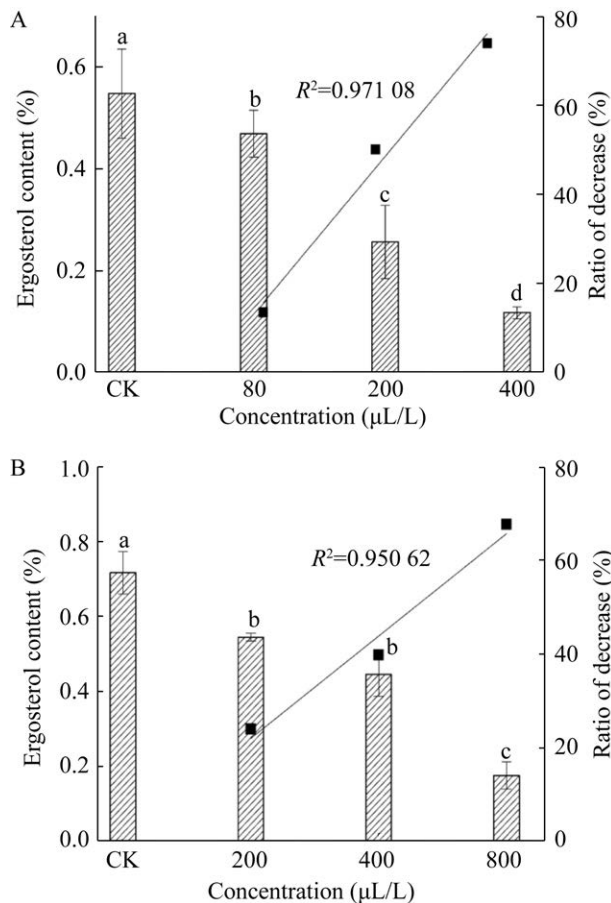


图5 不同浓度香芹酚(A)和丁香酚(B)对腐皮镰刀菌麦角固醇合成的抑制作用
Figure 5 Effects of carvacrol (A) and eugenol (B) at different concentration on ergosterol synthesis of *Fusarium solani*.

青霉菌和指状青霉菌的生长, 而 0.01%牛至精油对意大利青霉菌和指状青霉菌的抑菌率分别为 95.4%和 74.0%, 0.01%丁香精油对意大利青霉菌和指状青霉菌的抑制率分别为 53.4%和 44.9%^[20]。Abbaszadeh 等^[14]发现牛至精油主要单体化合物香芹酚对黑曲霉、烟曲霉、黄曲霉、赭曲霉、链格孢、灰葡萄孢、枝孢菌、橘青霉、黄青霉、尖孢镰刀菌和米根霉共 11 种食品相关真菌的最小抑菌浓度为 50–350 mg/L。同样地, 丁香酚能有效地抑制曲霉属和青霉属真菌, 最小抑菌浓度在 150–600 µg/mL 之间^[21]。侯辉宇

等^[22]研究发现, 香芹酚对黄瓜灰霉病菌、油菜菌核病菌、小麦全蚀病菌、棉花黄萎病菌和小麦茎基腐病菌菌丝生长的抑制活性较强, EC_{50} 分别为 9.09、22.45、24.28、28.40 和 28.80 mg/L。本文研究了香芹酚和丁香酚在体外对土传病菌腐皮镰刀菌均具有较高的抑菌活性, 呈现浓度依赖性。2 种酚类物质均能高效地抑制腐皮镰刀菌菌丝生长和分生孢子萌发, 并随着药剂有效浓度的增加, 病菌的菌落直径逐渐减小, 抑制率增大, 孢子萌发数降低, 香芹酚和丁香酚的 EC_{50} 值分别为 92.39 µL/L 和 263.00 µL/L。目前, 有关香芹酚和丁香酚对植物抗病活性方面研究较多, 但作用机理文献较少, 尤其这 2 种植物精油对腐皮镰刀菌的抗菌活性及其相关的抗菌机理均未见报道。

本实验进一步采用 SEM 观察菌丝细胞的微观结构。SEM 结果直观地反映出经香芹酚和丁香酚处理后, 腐皮镰刀菌菌丝形态结构均受到极大的损伤, 处理组菌丝相比未处理组菌丝出现严重的皱缩, 呈干瘪形态。Hou 等^[23]发现经香芹酚处理后, 灰葡萄孢菌丝受到严重的塌陷和损伤。葛达娥等^[24]发现经丁香酚处理后蓝莓上的链格孢孢子和菌丝严重变形, 表面出现大量褶皱, 胞内物质流失。本研究结果与香芹酚和丁香酚对其他植物病原菌的作用结果一致, 这表明香芹酚和丁香酚处理能破坏腐皮镰刀菌菌丝细胞膜和细胞壁结构, 导致菌丝不能维持正常的生理结构, 出现塌陷、皱缩和干瘪形态, 发生了严重损伤。

碘化丙啶(PI)不能穿过完整的细胞膜, 当细胞膜受损而丧失选择性时, PI 可进入细胞内与 DNA 结合呈现红色荧光, 根据此特点使用 PI 染色可研究细胞膜的完整性^[25]。Shu 等^[26]发现用熊果酸处理链格孢后, PI 染色能观察到明亮的红色荧光, 并且随着熊果酸浓度增加到

1 000 $\mu\text{g/mL}$, 发荧光的菌丝数目增多且菌丝荧光强度越强烈。腐皮镰刀菌菌丝的荧光强度和数量随处理浓度的增加而增加, 这与本实验的研究结果一致。本研究发现香芹酚和丁香酚处理后腐皮镰刀菌均有显著的细胞内容物泄露现象, 并且具有时间和浓度依赖效应。说明香芹酚和丁香酚处理后损伤了腐皮镰刀菌的细胞膜, 使细胞膜通透性增加, 内容物泄露, 并且香芹酚对腐皮镰刀菌细胞膜的损伤程度更加严重, 泄露量与时间呈线性增加^[27]。造成上述现象的原因可能是腐皮镰刀菌经香芹酚和丁香酚持续处理后, 2 种酚类物质的亲脂基团均会插入到细胞膜磷脂双分子层的疏水区从而溶解脂相, 并与细胞膜蛋白的疏水端结合, 影响通道蛋白的活性, 从而破坏了细胞膜的选择渗透性, 打破了细胞内环境稳态^[28]。

麦角固醇是真菌细胞膜的重要组成部分, 对确保细胞活力、膜的流动性、膜结合酶的活性、膜的完整性及细胞物质运输生理功能等起着重要作用, 因此抑制麦角固醇合成已经广泛应用于抗菌剂筛选的新途径^[29]。麦角固醇的减少会使真菌细胞膜受到损坏, 导致细胞膜功能异常, 进而造成细胞内容物泄漏, 甚至导致细胞破裂死亡, 因此麦角固醇含量的变化也是衡量细胞膜受损的重要指标。本文研究发现香芹酚和丁香酚均可以作用于腐皮镰刀菌细胞膜, 并不同程度地降低麦角固醇含量且香芹酚在腐皮镰刀菌麦角固醇合成上具有极显著的抑制效果。国内外学者在其他种属真菌上研究了香芹酚和丁香酚对麦角固醇合成的影响。Ahmad 等^[30]发现念珠菌经香芹酚处理后, 菌体细胞膜破损且麦角固醇含量大幅度下降。Zhao 等^[31]发现用丁香酚处理立枯丝核菌后, 菌丝体萎缩干燥、质壁分离、胞内组分流失, 并且丁香酚下调了菌体内 C-4 甲基甾醇氧化酶的表达, 从而

抑制麦角固醇的合成。总之, 这些研究结果说明香芹酚和丁香酚通过作用于细胞膜并影响麦角固醇合成的方式来发挥抑菌作用, 这与前文 SEM、PI 染色和胞质泄露结果一致。有学者研究表明, 精油作用于麦角固醇的途径可能是通过抑制真菌生物膜麦角固醇合成通路的相关基因如 *ERG11*、*ERG6* 和 *ERG4*, 从而使麦角固醇含量减少, 导致细胞膜完整性和通透性被破坏^[32]。

综上所述, 本研究以土传病原菌腐皮镰刀菌为靶标, 研究发现香芹酚和丁香酚能显著地抑制腐皮镰刀菌菌丝生长和孢子萌发, 其抑制效应具有浓度依赖特征。进一步从细胞膜角度研究其作用机理, 发现 2 种精油均能作用于腐皮镰刀菌细胞膜, 损坏病原真菌细胞结构, 破坏细胞膜完整性和通透性, 使细胞内物质外溢, 真菌不能维持正常生理活动, 从而达到抗菌的效果。本研究结果为镰刀菌类引起的土传病害防治药剂的开发提供了理论依据。

REFERENCES

- [1] 牛世全, 耿晖, 韩彩虹, 阎薇如, 达文燕. 甘肃陇西黄芪根腐病病原菌的分离与鉴定[J]. 西北师范大学学报(自然科学版), 2016, 52(2): 75-78, 83
Niu SQ, Geng H, Han CH, Yan WR, Da WY. Isolation and identification of pathogens causing *Astragalus membranaceus* root rot in Gansu Longxi[J]. Journal of Northwest Normal University: Natural Science, 2016, 52(2): 75-78, 83 (in Chinese)
- [2] Leslie JF, Summerell BA. The *Fusarium* Laboratory Manual[M]. Ames, Iowa, USA: Blackwell Publishing, 2006
- [3] Rampersad S. Pathogenomics and management of *Fusarium* diseases in plants[J]. Pathogens, 2020, 9(5): 340
- [4] Parikh L, Kodati S, Eskelson MJ, Adesemoye AO. Identification and pathogenicity of *Fusarium* spp. in row crops in Nebraska[J]. Crop Protection, 2018, 108: 120-127
- [5] 鲁萌萌, 李文茹, 周少璐, 孙廷丽, 谢小保. 生姜精油化学成分及其抗菌活性[J]. 微生物学通报, 2021, 48(4): 1121-1129

- Lu MM, Li WR, Zhou SL, Sun TL, Xie XB. Chemical component and antibacterial activity of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) essential oil[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(4): 1121-1129 (in Chinese)
- [6] Nazzaro F, Fratianni F, Coppola R, De Feo V. Essential oils and antifungal activity[J]. *Pharmaceuticals*, 2017, 10(4): 86
- [7] Gakuubi MM, Maina AW, Wagacha JM. Antifungal activity of essential oil of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. against selected *Fusarium* spp.[J]. *International Journal of Microbiology*, 2017, 2017: 8761610
- [8] Diáñez F, Santos M, Parra C, Navarro MJ, Blanco R, Gea FJ. Screening of antifungal activity of 12 essential oils against eight pathogenic fungi of vegetables and mushroom[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2018, 67(4): 400-410
- [9] 曾荣, 陈金印, 林丽超. 丁香精油及丁香酚对食品腐败菌的抑菌活性研究[J]. *江西农业大学学报*, 2013, 35(4): 852-857
- Zeng R, Chen JY, Lin LC. Antimicrobial activity of clove essential oils and eugenol against food-borne bacteria[J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2013, 35(4): 852-857 (in Chinese)
- [10] Nizamani MH, Abro MA, Gadhi MA, Keerio AU, Talpur MSA, Sajawal, Qazi S. Evaluation of different essential oils and biocontrol agents against *Alternaria alternata* the causal agent of fruit rot of jujube[J]. *Journal of Applied Research in Plant Sciences*, 2020, 1(1): 1-8
- [11] 许璐, 喻毅, 曹宇, 李瑶, 谢艳华, 李捷, 王四旺. 牛至油及其主要成分的体外抑菌实验[J]. *世界中医药*, 2020, 15(14): 2072-2075
- Xu L, Yu Y, Cao Y, Li Y, Xie YH, Li J, Wang SW. Experimental study on antibacterial activity of oregano oil and its main components *in vitro*[J]. *World Chinese Medicine*, 2020, 15(14): 2072-2075 (in Chinese)
- [12] 蓝蔚青, 曹奕, 陈燕, 潘迎捷, 孙晓红. 棘托竹荪提取液对单增李斯特菌的抑菌机理初步研究[J]. *食品工业科技*, 2015, 36(14): 152-155, 160
- Lan WQ, Cao Y, Chen Y, Pan YJ, Sun XH. Preliminary research on the antimicrobial mechanism of *Dictyophora echinvolvata* extracts against *Listeria monocytogenes*[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2015, 36(14): 152-155, 160 (in Chinese)
- [13] Gonçalves DC, Tebaldi De Queiroz V, Costa AV, Lima WP, Belan LL, Moraes WB, Pontes Póvoa Iorio NL, Corrêa Póvoa HC. Reduction of *Fusarium* wilt symptoms in tomato seedlings following seed treatment with *Origanum vulgare* L. essential oil and carvacrol[J]. *Crop Protection*, 2021, 141: 105487
- [14] Abbaszadeh S, Sharifzadeh A, Shokri H, Khosravi AR, Abbaszadeh A. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi[J]. *Journal De Mycologie Médicale*, 2014, 24(2): e51-e56
- [15] 戴雨芸, 李超, 袁中伟, 李欣越, 何泾正, 尹立子. 香芹酚抑制金黄色葡萄球菌生物被膜的形成[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(3): 813-820
- Dai YY, Li C, Yuan ZW, Li XY, He JZ, Yin LZ. Inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilm by carvacrol[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(3): 813-820 (in Chinese)
- [16] Ju J, Xie YF, Yu H, Guo YH, Cheng YL, Zhang RR, Yao WR. Synergistic inhibition effect of citral and eugenol against *Aspergillus niger* and their application in bread preservation[J]. *Food Chemistry*, 2020, 310: 125974
- [17] Wei J, Bi Y, Xue H, Wang Y, Zong Y, Prusky D. Antifungal activity of cinnamaldehyde against *Fusarium sambucinum* involves inhibition of ergosterol biosynthesis[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2020, 129(2): 256-265
- [18] Yu D, Wang J, Shao X, Xu F, Wang H. Antifungal modes of action of tea tree oil and its two characteristic components against *Botrytis cinerea*[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2015, 119(5): 1253-1262
- [19] Tian J, Wang YZ, Zeng H, Li ZY, Zhang P, Tessema A, Peng X. Efficacy and possible mechanisms of perillaldehyde in control of *Aspergillus niger* causing grape decay[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2015, 202: 27-34
- [20] 潘小军, 陈媛, 江和栋. 植物精油对柑橘保鲜效果的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 1(1): 1-9
- Pan XJ, Chen Y, Jiang HD. Effects of plant essential oils on the fresh-keeping of citrus[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 1(1): 1-9 (in Chinese)
- [21] Hu Q, Zhou MF, Wei SY. Progress on the antimicrobial activity research of clove oil and eugenol in the food antiseptics field[J]. *Journal of Food Science*, 2018, 83(6): 1476-1483
- [22] 侯辉宇, 李敏, 李爽, 杜鹏强, 赵特, 周琳. 牛至精油及其主要成分香芹酚和百里酚对 16 种植物病原真菌的抑制活性[J]. *植物保护学报*, 2020, 47(6): 1362-1369
- Hou HY, Li M, Li S, Du PQ, Zhao T, Zhou L. Inhibitory activities of *Origanum vulgare* essential oil,

- and its main components carvacrol and thymol against 16 plant pathogenic fungi[J]. Journal of Plant Protection, 2020, 47(6): 1362-1369 (in Chinese)
- [23] Hou HY, Zhang XY, Zhao T, Zhou L. Effects of *Origanum vulgare* essential oil and its two main components, carvacrol and thymol, on the plant pathogen *Botrytis cinerea*[J]. PeerJ, 2020, 8: e9626
- [24] 葛达娥, 魏照辉, 图尔荪阿依·图尔贡, 潘玥, 王帆, 陶宁萍, 周剑忠, 刘小莉. 丁香酚对蓝莓链格孢霉的抑制作用[J]. 食品科学, 2020, 41(19): 68-73
Ge DE, Wei ZH, Tursunay T, Pan Y, Wang F, Tao NP, Zhou JZ, Liu XL. Inhibitory effect of eugenol on *Alternaria* sp. isolated from blueberry[J]. Food Science, 2020, 41(19): 68-73 (in Chinese)
- [25] Li WS, Yuan SZ, Sun J, Li QQ, Jiang WB, Cao JK. Ethyl p-coumarate exerts antifungal activity *in vitro* and *in vivo* against fruit *Alternaria alternata* via membrane-targeted mechanism[J]. International Journal of Food Microbiology, 2018, 278: 26-35
- [26] Shu C, Zhao HD, Jiao WX, Liu BD, Cao JK, Jiang WB. Antifungal efficacy of ursolic acid in control of *Alternaria alternata* causing black spot rot on apple fruit and possible mechanisms involved[J]. Scientia Horticulturae, 2019, 256: 108636
- [27] Zhou D, Wang Z, Li M, Xing M, Xian T, Tu K. Carvacrol and eugenol effectively inhibit *Rhizopus stolonifer* and control postharvest soft rot decay in peaches[J]. Journal of Applied Microbiology, 2018, 124(1): 166-178
- [28] Si LL, Meng K, Tian ZY, Sun JQ, Li HQ, Zhang ZW, Soloveva V, Li HW, Fu G, Xia Q, et al. Triterpenoids manipulate a broad range of virus-host fusion via wrapping the HR2 domain prevalent in viral envelopes[J]. Science Advances, 2018, 4(11): eaau8408
- [29] Rodrigues ML. The multifunctional fungal ergosterol[J]. mBio, 2018, 9(5): DOI: 10.1128/mbio.01755-18
- [30] Ahmad A, Khan A, Akhtar F, Yousuf S, Xess I, Khan LA, Manzoor N. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*[J]. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2011, 30(1): 41-50
- [31] Zhao YT, Wang Q, Wu X, Jiang MF, Jin H, Tao K, Hou TP. Unraveling the polypharmacology of a natural antifungal product, eugenol, against *Rhizoctonia solani*[J]. Pest Management Science, 2021, 77(7): 3469-3483
- [32] Gao T, Zhou H, Zhou W, Hu LB, Chen J, Shi ZQ. The fungicidal activity of thymol against *Fusarium graminearum* via inducing lipid peroxidation and disrupting ergosterol biosynthesis[J]. Molecules, 2016, 21(6): 770