

· 研究论文 ·

丁香酚对灰葡萄孢的抑制作用研究

张杰^{1,2}, 王春梅², 程罗根¹, 陈浩², 石志琦^{*2}

(1. 南京师范大学生命科学学院, 南京 210097; 2. 江苏省农业科学院 食品质量与安全检测研究所, 南京 210014)

摘要: 香酚是从植物中提取的天然化合物。采用菌丝生长速率法测定了其对多种植物病原真菌的抑制作用以及田间分离得到的 7 株灰葡萄孢 *Botrytis cinerea* 对香酚的敏感性, 同时测定了香酚对 *B. cinerea* 03 孢子和菌核的抑制活性。结果显示, 香酚对多种植物病原真菌均有不同程度的抑制作用; 灰葡萄孢不同菌株对香酚的敏感性不同, EC_{50} 值在 29.97~83.62 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间; 香酚可抑制灰葡萄孢产孢, 但对孢子萌发无影响, 可抑制其菌核的产生和萌发。荧光染色结果表明香酚能破坏灰葡萄孢菌丝细胞膜。利用原子吸收光谱法和紫外分光光度法分别测定香酚处理前后菌丝培养液中 K^+ 浓度和 OD_{260} 值变化, 结果显示处理后 K^+ 浓度和 OD_{260} 值均升高。综上所述, 细胞膜可能是香酚对灰葡萄孢菌丝的作用位点。

关键词: 天然化合物; 香酚; 灰葡萄孢; 作用机制; 抗药性治理

中图分类号: S481.1; S482.292

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2008)01-0068-07

Inhibition Activity of Eugenol to *Botrytis cinerea*

ZHANG Jie^{1,2}, WANG Chun-mei², CHENG Luo-gen¹, CHEN Hao², SHI Zhizhi^{*2}

(1. College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China;

2. Institute of Food Safety, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract The antifungal activity of eugenol (a natural compound) against 10 fungal pathogens including *Botrytis cinerea* was determined by mycelial growth rate method. The results showed the sensitivity of 7 strains of *B. cinerea* to eugenol was different, and the EC_{50} values were ranging from 29.97 to 83.62 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Eugenol could reduce the sclerotium number, germination and sporulation, but had no effect on spores germination of *B. cinerea*. Hyphae of *B. cinerea* treated with eugenol showed strong propidium iodide fluorescence in the cytosol viewed with a fluorescence microscope. Eugenol could also increase the concentration of potassium ion and cellular materials in the medium. The results suggested that the cell membrane might be the target of eugenol.

Key words natural compound; eugenol; *Botrytis cinerea*; mode of action; resistance management

由灰葡萄孢 *Botrytis cinerea* 引起的灰霉病是一种世界性病害, 该病菌能广泛侵染多种水果、蔬菜和观赏植物的叶、茎、花和果实, 给生产带来巨大损失^[1]。目前生产上大多采用化学农药防治灰

霉病, 如苯胺基嘧啶类、苯并咪唑类、二甲酰亚胺类、N-苯基氨基甲酸酯类等, 由于田间连续使用, 病菌对上述几类杀菌剂已产生了不同程度的抗药性^[1]。其中贾晓华等^[2]研究发现, 江苏淮阴地区对

收稿日期: 2007-09-27; 修回日期: 2007-12-06

作者简介: 张杰 (1984-), 女, 硕士研究生; * 通讯作者 (Author for correspondence): 石志琦 (1966-), 女, 研究员, 主要从事天然化合物在农产品安全中的应用研究。联系电话: 025-84391863 E-mail: shizhizhi@jaas.ac.cn

基金项目: 江苏省农业高技术研究项目 (BG2006325); 南京市科技计划项目 (061b222015)。

嘧霉胺最不敏感的灰葡萄孢菌株和最敏感菌株的 EC_{50} 值相差 212 倍, 平均抗性比例为 43.64%。因此, 开发新的替代药品以延缓抗性的发展已势在必行。植物中含有天然很多化学成分, 从中筛选对植物病原真菌具有抗菌活性的天然化合物, 一方面可为灰霉病的防治提供新药剂, 另一方面还可对其进行结构修饰以期获得具有更高活性的化合物。

从丁香 *Eugenia caryophyllata* Thunb 中提取的丁香油具有较好的防霉作用, 并对食品中常见的腐败菌和产毒素菌的生长有明显的抑制作用^[3]。研究表明, 丁香粗提物对灰葡萄孢、蚕豆葡萄孢 *Botrytis fabae*、芸薹链格孢 *Alternaria brassicae*、立枯丝核菌 *Rhizoctonia cerealis* 等多种植物病原真菌均有抑制作用^[3-6]。丁香酚 (Eugenol $C_{10}H_{12}O_2$, 4-烯丙基-2-甲氧基苯酚) 是丁香挥发油的主要成分, 长期以来主要应用于医药上, 具有抑菌、麻醉、解热、抗氧化、抗肿瘤、促进透皮吸收、驱蚊等多种药理活性^[3, 7-13]。丁香酚对大鼠的急性经口毒性 (LD_{50}) 为 $1\ 930\ mg/kg$ ^[14], 按我国农药急性毒性分级标准属于低毒农药。近年来有研究表明, 丁香酚对植物病原真菌如白腐真菌采绒革盖菌 *Coriolis versicolor*^[15]、褐腐菌硫磺菌 *Laetiporus sulphureus*^[15, 16]、白腐菌桦茸褶菌 *Lenzites Betulina*^[16] 和蚕豆葡萄孢 *B. fabae*^[17] 也有抑制作用。但尚未见关于丁香酚对灰葡萄孢的抑制作用及作用机制的研究报道。笔者研究了丁香酚对灰葡萄孢菌丝、孢子以及菌核的抑制作用, 并初步探讨了其作用机制。

1 材料与方法

1.1 药剂及试剂

纯度为 99% 的丁香酚 (Eugenol) 购自 Sigma 公司, 用 70% 的乙醇配制成 $1 \times 10^4\ \mu g/mL$ 的母液。

对照药剂 96% 的嘧霉胺 (pyrimethanil) 由昆山瑞泽农药有限公司提供。

PI(碘化丙啶)染色液配制: PI 5 mg RNA 酶 (无 DNA 酶活性) 100 mg 含 0.1% Triton X-100 的 PBS 缓冲液 100 mL。将 PI 溶于缓冲液后, 加入 RNA 酶, $-20^\circ C$ 冰箱中避光保存。

1.2 供试病菌

串珠镰刀菌 *Fusarium moniliforme*, 核盘菌

Sclerotinia sclerotiorum, 甜菜生尾孢菌 *Cercospora beticola*, 疣孢霉菌 *Mycogone perniciosa*, 辣椒疫霉 *Phytophthora capsici*, 禾谷镰刀菌 *Fusarium gramineum*, 轮纹大茎点菌 *Macrophoma kawatsukai*, 瓜亡革菌 *Thanatephorus cucumeris*, 链格孢菌 *Alternaria alternata* 和灰葡萄孢 *Botrytis cinerea* 由江苏省农业科学院食品质量与安全检测研究所提供。

由田间病果上分离的灰葡萄孢, 经纯化鉴定后分别编号。B. cinerea 01 和 03 分离自江苏省句容市草莓果实, B. cinerea 02 购自中国科学院微生物研究所, B. cinerea 04 分离自安徽省和县番茄果实, B. cinerea 05 分离自江苏省东海县草莓果实, B. cinerea 06 分离自江苏省南京市双闸番茄果实, B. cinerea 07 由辽宁大连市出入境检验检疫局提供。除 B. cinerea 02 和 B. cinerea 07 外, 其他灰葡萄孢均采用多菌灵 (carbendazim)、嘧霉胺 (pyrimethanil)、乙霉威 (dithofencarb) 等化学药剂防治。

1.3 试验方法

1.3.1 丁香酚对植物病原真菌的抑菌谱测定

采用菌丝生长速率法^[18]: 在菌落边缘处打取直径为 6 mm 的菌碟, 接入含丁香酚系列浓度 (0, 25, 50, 100, 150, 200 $\mu g/mL$) 的 PDA 培养基平板中央, $25^\circ C$ 光照培养 2~6 d 十字交叉法测量菌落直径。所得数据用 DPS 统计软件求出毒力回归方程、 EC_{50} 值和 95% 置信限。每处理设 3 次重复。

1.3.2 灰葡萄孢不同菌株菌丝生长对丁香酚和嘧霉胺的敏感性测定 方法同 1.3.1 节, 测定丁香酚对灰葡萄孢不同菌株的 EC_{50} 值, 设嘧霉胺对照。每处理设 3 次重复。

1.3.3 灰葡萄孢孢子悬浮液制备^[19] 在 PDA 平板上接种灰葡萄孢菌碟, $25^\circ C$ 光照培养 10~15 d 用含体积分数 0.01% Tween-20 的无菌水冲洗下孢子, 四层无菌纱布过滤除去菌丝, 血球计数板于 Nikon Y S100 显微镜下计数, 用无菌水配制成浓度为 1×10^6 个/mL 的孢子悬浮液。

1.3.4 丁香酚对灰葡萄孢产孢能力的影响^[20]

挑取灰葡萄孢菌碟接到含不同浓度 (同 1.3.1 节) 丁香酚的 PDA 平板上, $25^\circ C$ 恒温光照培养 12 d 按照 1.3.3 节方法制备孢子悬浮液, 定容至 15 mL, 稀释 2 倍后用血球计数板计数, 比较不同处理的孢子浓度。每处理设 3 次重复。

1.3.5 对孢子萌发的影响^[21] 将 1.3.3 节制备的孢子悬浮液滴加在载玻片上, 置于用无菌滤纸

保湿的培养皿中,分别用不同浓度(同 1.3.1节)的丁香酚处理,设咪霉胺对照(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 25 $^{\circ}\text{C}$ 培养, 12 h后显微镜下观察各处理孢子萌发情况,以芽管长度超过孢子短半径视为萌发,计算孢子萌发率。每处理 4次重复,观察 8个视野至少 200个孢子。

1.3.6 对菌核形成的影响^[22] 在 1.3.2节试验基础上观察不同浓度丁香酚处理对菌核形成的影响,光照培养 14 d后记录各处理产生菌核的数量。

1.3.7 对菌核萌发的影响^[22] 从 1.3.2节试验的空白对照平板上收集大小和颜色基本一致的菌核,采用以下两种方法处理后于 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温光照培养,统计比较两种处理的菌核萌发率。每处理测定 21个菌核,分别放置在 3个平板上。

方法一:将菌核浸渍于不同浓度(同 1.3.1节)的丁香酚药液中 1 min,风干后置于空白 PDA 平板上。

方法二:将未用药剂处理的菌核置于含上述系列浓度丁香酚的 PDA 平板上。

1.3.8 对细胞膜完整性的影响^[18]

对孢子细胞膜完整性的影响:用 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的丁香酚处理孢子,分别于 15 30 60 120 240 min取 40 μL 滴加在载玻片上,然后用 10 μL PI染色液室温避光染色 15 min, Olympus BX-60型荧光显微镜于绿色激发光下观察。

对菌丝细胞膜完整性的影响:将孢子悬浮液接入 PD 液体培养基中, 25 $^{\circ}\text{C}$ 、140 r/min 摇培 2 d

挑取菌丝,其余处理方法同孢子处理。

1.3.9 对菌丝内容物释放的影响

260 nm 紫外吸收物质^[12,23]:挑取 3个直径 6 mm 的灰葡萄孢菌碟接入 50 mL PD 液体培养基中, 25 $^{\circ}\text{C}$ 、140 r/min 摇培 2 d 过滤菌丝,用 0.05 mol/L、pH 7.2 的 PBS 缓冲液冲洗 3次,转移到 20 mL PBS 缓冲液中,加入前述系列浓度药液。加药前取样一次,加药混匀后再取样一次,然后放入摇床继续振荡, 1 h 后取样,用 LAMDA-25 紫外分光光度计测定培养液的 OD₂₆₀值。每处理设 3次重复。

K⁺浓度^[23-26]:摇培 2 d 的菌丝用 2.5 mol/L、pH 7.0 的 Hepes 缓冲液冲洗,转移到 60 mL Hepes 缓冲液中,加药处理。分别于处理后 0.3 5. 10 min 取培养液,用 AA Analyst 300 原子分光光度计测定各样品中 K⁺浓度。每处理设 3次重复。

2 结果与分析

2.1 丁香酚对植物病原真菌的抑菌谱测定

丁香酚的抑菌谱较广(见表 1),对供试病原菌均有抑制作用,但对不同植物病原真菌的抑制效果差异较大,对灰葡萄孢和核盘菌的抑制效果明显, EC₅₀值分别为 38.62 和 39.94 $\mu\text{g}/\text{mL}$,其次是对疣孢霉菌和甜菜生尾孢菌, EC₅₀值为 46.70 和 59.63 $\mu\text{g}/\text{mL}$,禾谷镰刀菌和辣椒疫霉对丁香酚的敏感性较差, EC₅₀值均在 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上。

表 1 丁香酚对不同植物病原真菌菌丝生长的抑制作用

Table 1 Antifungal activity of eugenol against 10 fungal pathogens including *B. cinerea*

植物病原菌 Pathogenic fungi	毒力回归方程 Regression equation	相关系数(R) Correlation coefficient	有效中浓度 EC ₅₀ value/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	95%置信限 95% CL/($\mu\text{g}/\text{mL}$)
串珠镰刀菌 <i>F. moniliforme</i>	$Y = 2.2199x + 0.6079$	0.9781	95.17	71.76~126.20
核盘菌 <i>S. sclerotium</i>	$Y = 1.9056x + 1.9482$	0.9990	39.94	37.95~42.04
甜菜生尾孢菌 <i>C. beticola</i>	$Y = 2.1272x + 1.2231$	0.9887	59.63	50.26~70.76
疣孢霉菌 <i>M. pemiciosa</i>	$Y = 2.2561x + 1.2338$	0.9875	46.70	39.10~55.78
辣椒疫霉 <i>P. capsici</i>	$Y = 4.1630x - 4.3882$	0.9628	179.95	157.10~206.20
禾谷镰刀菌 <i>F. gramineum</i>	$Y = 2.5205x - 0.0612$	0.9825	101.87	86.37~120.20
轮纹大茎点菌 <i>M. kuwatsukai</i>	$Y = 2.6068x + 0.2729$	0.9701	65.07	53.73~78.81
瓜亡革菌 <i>T. cucumeris</i>	$Y = 2.4437x + 0.5390$	0.9739	66.91	56.30~79.52
链格孢菌 <i>A. alternata</i>	$Y = 4.3230x - 3.5878$	0.9754	96.94	88.44~106.28
灰葡萄孢 <i>B. cinerea</i>	$Y = 0.8110x + 3.7131$	0.9869	38.62	31.70~47.06

2.2 灰葡萄孢不同菌株菌丝生长对丁香酚和咪霉胺的敏感性

霉胺的敏感性不同。丁香酚和咪霉胺对 *B. cinerea* 01 的 EC₅₀值分别为 63.63 和 9.74 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 对 *B. cinerea* 07 的 EC₅₀值分别为 83.62 和 6.72 $\mu\text{g}/\text{mL}$,

由图 1 可知,不同灰葡萄孢菌株对丁香酚和咪

对 *B. cinerea* 02 的 EC_{50} 值分别为 74.86 和 51.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 其余菌株间差异较小。选取其中敏感性处于中等水平的 *B. cinerea* 03 菌株测定丁香酚对其产孢量、孢子萌发、菌核形成、细胞膜完整性及菌丝内溶物释放的影响。

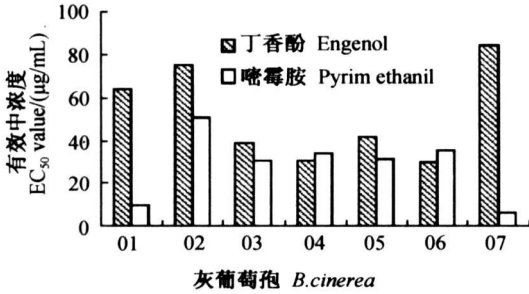


图 1 丁香酚和嘧霉胺对不同灰葡萄孢菌株菌丝生长的影响

Fig 1 Effect of eugenol and pyrimethanil on mycelial growth of *B. cinerea* on PDA

2.3 丁香酚对灰葡萄孢菌株产孢量的影响

丁香酚对灰葡萄孢产孢有明显的抑制作用。100 和 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 丁香酚处理组的产孢量分别为对照的 61.15% 和 48.90% (图 2)。但丁香酚各浓度处理间差异不显著, 无明显的浓度效应。

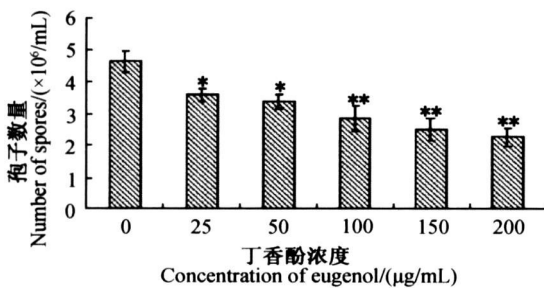


图 2 丁香酚对灰葡萄孢产孢量的影响

Fig 2 Effect of eugenol on sporulation of *B. cinerea* on PDA

* 表示药剂处理和对照之间差异显著 ($P < 0.05$);

** 表示不同药剂处理之间差异显著。下同。

* Mean values were significantly different between the treatment and the control ($P < 0.05$).

** Mean values were significantly different between treatments. The same as below.

2.4 丁香酚对灰葡萄孢孢子萌发的影响

当空白对照孢子萌发率为 100% 时, 嘧霉胺对照萌发率为 0, 但不同浓度丁香酚处理孢子萌发率均达到 98% 以上, 说明丁香酚对灰葡萄孢孢子萌发无影响。

2.5 丁香酚对灰葡萄孢菌核形成的影响

丁香酚浓度为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 菌核产生数量仅为对照的 17%, 丁香酚浓度 ≥ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 各处理均无菌核产生, 由此可见丁香酚可显著抑制灰葡萄孢的菌核形成 (表 2)。

表 2 丁香酚对灰葡萄孢菌核形成的影响

Table 2 Effect of eugenol on number of sclerotium of *B. cinerea*

丁香酚浓度 Concentration of eugenol/ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	菌核数量 Number of sclerotium
0	319
25	54
50	0
100	0
150	0
200	0

2.6 丁香酚对灰葡萄孢菌核萌发的影响

由图 3 可知, 方法一处理中当丁香酚浓度达 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时菌核萌发率与对照相比明显下降; 而方法二处理中丁香酚浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时菌核萌发率已显著下降, 丁香酚浓度达 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 菌核萌发率为零。两种处理方法下菌核萌发率的不同可能是由于菌核和丁香酚接触的时间不同, 方法一中菌核和药剂接触的时间短, 只有高浓度处理才能影响菌核萌发, 方法二中接触时间长, 低浓度药剂处理就可以显著影响菌核萌发。

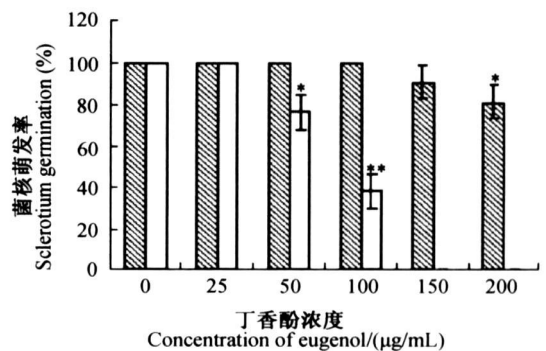


图 3 丁香酚对灰葡萄孢菌核萌发的影响

Fig. 3 Effect of eugenol on sclerotium germination of *B. cinerea*

注: \blacksquare —将菌核浸渍于不同浓度的丁香酚药液中 1 min, 风干后置于空白 PDA 平板上。□—将未用药剂处理的菌核置于含不同浓度丁香酚的 PDA 平板上。

Note: \blacksquare —Sclerotiums were put in sterile distilled water containing different concentration of eugenol for 1 min, after air-dried put on PDA. □—Sclerotiums were put on PDA containing different concentration of eugenol.

2.7 丁香酚对灰葡萄孢细胞膜完整性的影响

PI是一种常用的细胞核荧光染色剂,与细胞核中的DNA结合后,可在绿色光(540 nm波长)的激发下,在600 nm(红色光)处发出明亮的荧光。PI不能透过完整的细胞膜,当完整的真菌孢子或菌丝细胞膜受到损伤后才可以进入孢子或菌丝内部与核酸结合发出荧光。如图4所示,丁香酚处理15 min后,就可以在荧光显微镜下观察到大部分菌丝被染成了红色,而对照几乎没有被染色。这说明100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的丁香酚能够破坏灰葡萄孢菌丝膜的通透性。但是孢子在长时间处理(240 min)下仍不能被染色,说明丁香酚不容易破坏灰葡萄孢孢子膜的透性。这一结果和丁香酚能够抑制灰葡萄孢菌丝生长(2.2节),但对孢子萌发没有影响(2.4节)一致。

2.8 丁香酚对灰葡萄孢菌丝内容物释放的影响

与对照相比,丁香酚处理后菌丝内容物释放明显增加(图5)。A图中各处理浓度间有明显的浓度效应,100和200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 丁香酚处理1 h后培养液的OD₂₆₀值分别升高了56.54%和73.67%,而对照仅升高了10.03%;100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 丁香酚处理3 min后培养液中K⁺浓度明显增加,3 min后基本保持不变,但高于对照K⁺浓度。结合2.7节结果,说明丁香酚可以使菌丝细胞膜破损,膜透性增加。

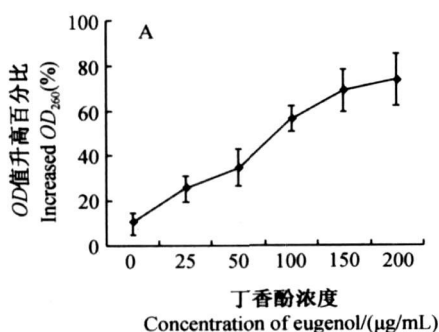


图5 丁香酚对灰葡萄孢菌丝内容物释放的影响

Fig 5 Effect of eugenol on the release of cellular materials from *B. cinerea*

A: 紫外吸收物质的释放; B: K⁺浓度的变化。

A: Release of UV-absorbing materials B: Change of potassium ion concentration

3 讨论

丁香酚对子囊菌、卵菌、丝核菌和半知菌等不同种类真菌均有抑制作用,表明其抑菌谱较广。笔者首次以灰葡萄孢为对象研究了丁香酚对植物

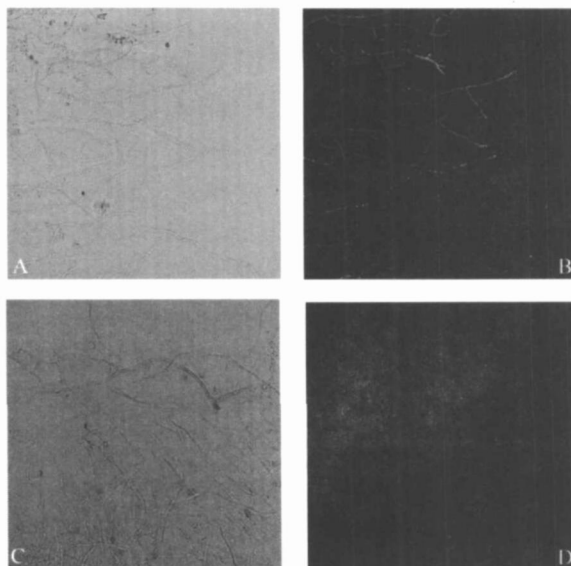
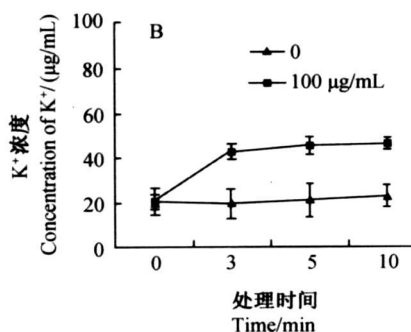


图4 丁香酚对灰葡萄孢菌丝细胞膜完整性的影响

Fig 4 Fluorescence microscopy of *B. cinerea* treated with PI

(A)可见光下观察丁香酚(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)处理过的菌丝;(B)荧光下观察丁香酚(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)处理过的菌丝;(C)可见光下观察对照菌丝;(D)荧光下观察对照菌丝。

(A) *B. cinerea* treated with eugenol (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) viewed by DIC; (B) *B. cinerea* treated with eugenol (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) viewed by fluorescence; (C) Control mycelia (without eugenol addition) viewed by DIC; (D) Control mycelia (without eugenol addition) viewed by fluorescence.



病原真菌的抑制活性。离体试验表明,不同来源灰葡萄孢菌株对丁香酚的敏感性不同,这可能与不同地区各菌株的遗传背景和用药模式不同等因素有关。对菌株不同发育阶段抑制作用的研究表明,丁香酚能抑制孢子和菌核产生,并能抑制菌核

萌发。而病菌能以菌核在土壤里越冬,或以菌丝及分生孢子在残体、地表及土壤内越冬,成为第二年初的侵染源^[27]。以此推测丁香酚可从侵染源头抑制灰霉病害的发生。且丁香酚易挥发,为其代替含氯药剂百菌清^[28]采用大棚熏蒸的方式防治灰霉病提供了可能性。丁香酚对灰葡萄孢孢子萌发无明显影响,这可能与孢子具有特殊的孢子壁有关。而对照药剂啞霉胺对灰葡萄孢孢子萌发有很强的抑制作用,说明丁香酚和啞霉胺对灰葡萄孢的作用机制可能不同。本研究仅测定了丁香酚对灰葡萄孢的离体抑制效果,关于丁香酚对灰霉病防效的盆栽及小区试验还有待进一步进行。

PI染色试验表明丁香酚对灰葡萄孢孢子细胞膜透性无明显影响,但在短时间(15 min)内即可破坏菌丝细胞膜的透性。进一步研究测定了丁香酚处理后菌丝培养液的 K^+ 浓度和 OD_{260} 值变化,结果显示,100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 丁香酚处理3 min后培养液中 K^+ 浓度明显升高,而此时灰葡萄孢菌丝形态和 OD_{260} 值并没有明显变化。培养液的紫外吸收值变化是细胞裂解的重要指标,反映了蛋白质及其他大分子物质的外流情况^[23]。丁香酚处理1 h后 OD_{260} 值明显升高(图5A),与Bennis等^[12]报道丁香酚能增加酿酒酵母菌*Saccharomyces cerevisiae*在260 nm处吸收物质的释放是一致的。结合以上结果,推测可能在丁香酚处理的早期,菌丝细胞膜对 K^+ 的选择通透性增加,随着处理时间延长,细胞破裂,培养液 OD_{260} 值升高^[23,25]。Gill等^[11]发现丁香酚能抑制李斯特菌*Listeria monocytogenes*和沙克乳酸杆菌*Lactobacillus sakei*的ATPase活性,进而影响其能量代谢。Usta等^[8]的研究表明,丁香酚可抑制小鼠肝脏细胞 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 活性,促进 $\text{F}_0\text{-F}_1\text{ATPase}$ 活性。正常细胞内外存在离子梯度差,细胞内的 K^+ 浓度高于外环境中 K^+ 浓度,这种离子梯度是由分布在膜上的 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 维持的,通过水解ATP提供的能量主动向内运输 K^+ ,当 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 活性被抑制时,不能正常将细胞外的 K^+ 运输至细胞内,导致胞外 K^+ 浓度升高^[29]。由此推测丁香酚可能会影响灰葡萄孢菌丝体的 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 活性。综上所述,细胞膜可能是丁香酚作用于灰葡萄孢菌丝的位点,但是究竟作用于细胞膜上的哪种成分及其作用模式还有待进一步研究。

啞霉胺是目前生产上防治灰霉病常用的药剂,属苯胺基啞啉类,可抑制灰葡萄孢菌丝内甲硫

氨酸的生物合成,并抑制病菌胞外蛋白酶(包括水解酶)的分泌,减少病菌侵入位点寄主细胞的死亡^[2,30]。由于灰葡萄孢对啞霉胺的抗药性由单基因控制,产生抗药性的风险很高^[31,32]。目前,在辽宁^[33]、江苏^[2]和浙江^[30]等省已有抗药性菌株的报道。本研究测得啞霉胺对灰葡萄孢的 EC_{50} 值在6.72~51.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间(图1),高于以往报道的数值^[2,30,33,34],可能是由于长期单一使用造成抗性增加。采用不同作用机制的复配药剂对病害进行防治是延缓抗药性的一种有效途径,本研究表明丁香酚和啞霉胺对灰葡萄孢的作用机制不同,因此下一步将考虑研究丁香酚与啞霉胺的复配作用。

参考文献:

- [1] BOUCHRA C, ACHOURIM, DRISSI HASANI L M, et al. Chemical Composition and Antifungal Activity of Essential Oils of Seven Moroccan Labiate against *Botrytis cinerea* Pers Fr [J]. *J Ethnopharmacol* 2003, 89: 165-169.
- [2] JIA Xiao-hua (贾晓华). Sensitivity Baselines of *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotium* to Pyrimethanil and Resistance of *Botrytis cinerea* (番茄灰霉病菌和油菜菌核菌对啞霉胺的敏感基线及番茄灰霉病菌抗药性研究) [D]. Nanjing (南京): Nanjing Agricultural University (南京农业大学), 2004.
- [3] LOU Xing-bing (楼兴隆), LI Xiaoming (李晓明), ZHANG An-ling (张鞍灵), et al. 丁香油抑菌成分研究 [J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica* (西北农业学报), 2006, 15(3): 91-93.
- [4] WANG Shu-tong (王树桐), CAO Ke-qiang (曹克强), ZHANG Feng-qiao (张凤巧), et al. 中药丁香提取物对番茄灰霉病菌抑制作用及生防效果 [J]. *Acta Phytopathologica Sinica* (植物病理学报), 2005, 35(6): 91-94.
- [5] GUO Song-nian (郭松年), JING Ze-liang (井泽良), SUN Hai-yan (孙海燕), et al. 丁香提取物对三种果实致腐真菌的抑制作用研究 [J]. *Food Research and Development* (食品研究与开发), 2006, 27(3): 160-161.
- [6] OXENHAM S K, SVOBODA K P, WALTERS D R. Altered Growth and Polyanine Catabolism Following Exposure of the Chocolate Spot Pathogen *Botrytis fabae* to the Essential Oil of *Ocimum basilicum* [J]. *Mycologia*, 2005, 97(3): 576-579.
- [7] PENG Zhai-biao (彭宅彪), ZHANG Qiong-guang (张琼光), DAI Hong-jian (代虹健), et al. 丁香酚的药理学研究进展 [J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research* (时珍国医国药), 2006, 17(10): 2079-2081.
- [8] USTA J KREYD NYEH S, BAMABE P, et al. Comparative Study on the Effect of Cinnamomum and Clove Extracts and their Main Components on Different Types of ATPases [J]. *Hum Exp Toxicol* 2003, 22: 355-362.

- [9] LEE M H, YEON K Y, PARK C K, et al Eugenol Inhibits Calcium Currents in Dental Afferent Neurons [J]. J Dent Res, 2005, 84(9): 848-851
- [10] GHOSH R, NADIM NTY N, FITZPATRICK JE, et al Eugenol Causes Melanoma Growth Suppression through Inhibition of E2F1 Transcriptional Activity [J]. J Biol Chem, 2005, 280(7): 5812-5819.
- [11] GILL A O, HOLLEY R A. Mechanisms of Bactericidal Action of Cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of Eugenol against *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* [J]. Appl Environ Microb, 2004, 70(10): 5750-5755.
- [12] BENNIS S, CHAMIEF, CHAMIN, et al Surface Alteration of *Saccharomyces cerevisiae* Induced by Thymol and Eugenol [J]. Lett Appl Microbiol, 2004, 38 454-458.
- [13] GAYOSO C W, LMAEO, OLIVERA V T, et al Sensitivity of Fungi Isolated from Onychomycosis to Eugenol, Caryophyllene Essential Oil and Eugenol [J]. Fitoterapia, 2005, 76: 247-249.
- [14] STICHT F D, SMITH R M. Eugenol: Some Pharmacologic Observations [J]. J Dent Res, 1971, 50(6): 1531-1535.
- [15] WANG S Y, CHEN P F, CHANG S T. Antifungal Activities of Essential Oils and their Constituents from Indigenous Cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) Leaves against Wood Decay Fungus [J]. Bioresource Technol, 2005, 96 813-818.
- [16] YEN T B, CHANG S T. Synergistic Effects of Cinnamaldehyde in Combination with Eugenol against Wood Decay Fungus [J]. Bioresource Technol, 2008, 99: 232-236.
- [17] OXENHAM S K, SVOBODA K P, WALTERS D R. Eugenol Reduces Growth and Increases Activity of S-adenosylmethionine Decarboxylase in the Phytopathogenic Fungus *Botrytis fabae* [J]. Phytoparasitica, 2005, 33: 247-252.
- [18] JIA L, TIAN S P, MENG X H, et al. Effects of Chitosan on Control of Postharvest Diseases and Physiological Responses of Tomato Fruit [J]. Postharvest Biol Tec, 2007, 44: 300-306
- [19] MERSDROBY S, DAVIDSON H, et al Suppression of Botrytis Rot in Cut Flowers by Postharvest Application of Methyl Jasmonate [J]. Postharvest Biol Tec, 1998, 13: 235-243.
- [20] MILLS A A S, PLATT H W, HURTA R A R. Effect of Salt Compounds on Mycelial Growth, Sporulation and Spore Germination of Various Potato Pathogens [J]. Postharvest Biol Tec, 2004, 34: 341-350.
- [21] LIU Xiaohong(刘小红), LI Jianqiang(李健强), ZHOU Ligang(周立刚), et al 丁布对小麦赤霉病菌和玉米小斑病菌的抑制作用 [J]. Mycosystema(菌物学报), 2004, 23(1): 109-114.
- [22] PAN Jinju(潘金菊), LIU Feng(刘峰), MU Wei(慕卫), et al 不同生育阶段黄瓜核病菌对几种三唑类杀菌剂的敏感性 [J]. Chin J Pestic Sci(农药学报), 2006, 8(2): 125-128.
- [23] MNAHK C J, FARIAS M E, SESMA F, et al Effect of Enterocin CRL35 on *Listeria monocytogenes* Cell Membrane [J]. FEMS Microbiol Lett, 2000, 192 79-83.
- [24] BENITO B, GARCIADEBLAS B, SCHREIER P, et al Novel P-Type ATPases Mediate High-affinity Potassium or Sodium Uptake in Fungi [J]. Eukaryot Cell, 2004, 3(2): 359-368.
- [25] MCAULIFFE O, RYAN M P, PAUL ROSS R, et al Lacticin 3147, a Broad-spectrum Bacteriocin Which Selectively Dissipates the Membrane Potential [J]. Appl Environ Microb, 1998, 64(2): 439-445.
- [26] JANG W S, KIM H K, LEE K Y, et al Antifungal Activity of Synthetic Peptide Derived from Habcidin Antimicrobial Peptide from the Tunicate *Habocynthia aurantium* [J]. FEBS Lett, 2006, 580: 1490-1496.
- [27] JIANG Wei(姜巍), WANG Deshuang(王德爽). 番茄灰霉病的综合防治 [J]. Modern Agriculture(现代农业), 2007, (8): 22
- [28] LIU Minyan(刘敏艳), LI Jianjun(李建军), HU Guanfang(胡冠芳). 20% 棚菌克烟剂在春季大棚黄瓜上的残留量分析 [J]. Gansu Agr Sci and Tech(甘肃农业科技), 2007, 6 21-23.
- [29] WANG Jingyan(王镜岩), ZHU Sheng-geng(朱圣庚), XU Chang-fa(徐长法). Biochemistry (Vol 2, 3rd Edition)(生物化学. 第三版下册) [M]. Beijing(北京): Higher Education Press(高等教育出版社), 2002: 49-50.
- [30] YIN Limei(印利梅), LI Qian(礼茜), LI Hongye(李红叶). 浙江省茄科蔬菜灰霉病菌对啞霉胺的抗性 [J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis(浙江农业学报). 2007, 19(2): 123-126.
- [31] CHAPELAND F, FRIFZ R, LANEN C, et al Inheritance and Mechanism of Resistance to Anilino-pyrimidine Fungicides in *Botrytis cinerea* (*Botryotinia fuckeliana*) [J]. Pestic Biochem Physiol, 1999, 64 85-100
- [32] HILBER U W, HILBER-BODMER M. Genetic Basis and Monitoring of Resistance of *Botryotinia fuckeliana* to Anilino-pyrimidines [J]. Plant Dis, 1998, 82(5): 496-500
- [33] JI Mingshan(纪明山), QI Zhiqiu(祁之秋), ZHAO Ping(赵平), et al 番茄灰霉病菌对啞霉胺抗药性的试验 [J]. J Shenyang Agric Univ(沈阳农业大学学报), 2002, 33(5): 345-347.
- [34] WANG Yanan(王亚南), SONG Ping(宋萍), ZHAO Xusheng(赵绪生), et al 植物提取物 Ts39与啞霉胺原药混剂对番茄灰霉病菌联合毒力研究 [J]. J Agric Univ Hebei(河北农业大学学报), 2005, 28(6): 68-72.

(Ed TANG J)