

13 种萜类化合物对胶孢炭疽菌和链格孢的抑制活性

杨婷^{1,2}, 史红安^{1,2}, 李聪丽^{1,2}, 李建华¹,
王立华¹, 李国元¹, 张志林^{1*}

(1. 特色果蔬质量安全控制湖北省重点实验室, 湖北工程学院生命科学技术学院, 孝感 432000;

2. 湖北大学生命科学学院, 武汉 430062)

摘要 炭疽菌 *Colletotrichum* 和链格孢 *Alternaria* 是引起植物病害的重要真菌, 给农业生产造成巨大的损失。本研究选取 13 种萜类化合物, 采用菌丝生长速率法对胶孢炭疽菌、链格孢进行抑菌活性分析。研究结果表明: 香芹酚、丁香酚、异丁香酚、枯茗醛、百里香酚对两种病原菌有较好的抑菌活性, 其中香芹酚对胶孢炭疽菌和链格孢的抑菌活性最强, IC_{50} 分别为 40.89 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 18.19 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。本试验为植物精油和天然杀菌剂的开发利用提供理论依据。

关键词 萜类化合物; 抑菌活性; 胶孢炭疽菌; 链格孢

中图分类号: S432 文献标识码: A DOI: 10.3969/j.issn.0529-1542.2017.02.034

Antifungal activity of 13 terpenoid compounds against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Alternaria* sp.

Yang Ting^{1,2}, Shi Hongan^{1,2}, Li Congli^{1,2}, Li Jianhua¹, Wang Lihua¹, Li Guoyuan¹, Zhang Zhilin¹

(1. Hubei Key Laboratory of Quality Control of Characteristic Fruits and Vegetables, College of Life Science and Technology, Hubei Engineering University, Xiaogan 432000, China;

2. College of Life Science, Hubei University, Wuhan 430062, China)

Abstract *Colletotrichum* and *Alternaria* are the important plant pathogenic fungi, which have caused great loss to agricultural production. 13 terpenoid compounds were selected to test their antifungal activity on *Colletotrichum gloeosporioides* and *Alternaria* sp. by mycelium growth rate method. The results showed that carvacrol, eugenol, isoeugenol, cuminaldehyde and thymol had good antimicrobial activities on the two pathogens, and the antifungal activity of carvacrol was the strongest with the IC_{50} values of 40.89 $\mu\text{g}/\text{L}$ and 18.19 $\mu\text{g}/\text{L}$, respectively. The results provide theory basis for development and utilization of the plant essential oil and natural fungicide.

Key words terpenoid compounds; antifungal activity; *Colletotrichum gloeosporioides*; *Alternaria* sp.

炭疽菌 *Colletotrichum* 和链格孢 *Alternaria* 引起的植物病害, 给农业生产造成巨大的损失^[1-2]。在长期的选择压力下, 病原菌抗药性不断增强, 常用药剂防治效果逐年下降。因此, 寻找新型农药、加强病原菌抗药性治理成为病害综合防治的迫切需要。

精油是从植物中提取的具有挥发性、分子量较小的次生代谢物质^[3]。其成分较为复杂, 包含芳香族化合物、脂肪族化合物、萜类化合物、含硫含氮化合物及其含氧衍生物如酮、酚、醛、醇、酸、酯等^[4]。研究表明: 精油具有抑菌活性强、不易产生抗性等优点, 是一种安全有效的天然杀菌剂^[5-7]。本文选取酮、酚、

醛等 13 种萜类化合物, 研究其对胶孢炭疽菌和链格孢的活性, 筛选活性好的萜类化合物, 以期为植物提取物的利用和天然杀菌剂的开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试萜类化合物

丁香酚 (eugenol)、百里香酚 (thymol)、香芹酚 (carvacrol)、异丁香酚 (isoeugenol)、薄荷酮 [(−)-menthone]、香芹酮 [(−)-carvone]、长叶薄荷酮 [(+)-pulegone]、马鞭草烯酮 [(−)-verbenone]、小

收稿日期: 2016-04-24 修订日期: 2016-07-25

基金项目: 湖北省自然科学基金(2014CFB571); 湖北省教育厅科研项目(B2016185, D20102704)

* 通信作者 E-mail: zhangzhilin913@sina.com

茴香酮[(-)-fenchone]、苧酮[(+)-camphor]、柠檬醛(citral)、香茅醛(citronellal)、枯茗醛(cuminaldehyde)均购于梯希爱(上海)化成工业发展有限公司,纯度大于 95%。

1.1.2 病原菌

胶孢炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides* 和链格孢 *Alternaria* sp. 从湖北孝感市区油茶病株上采集,利用常规组织分离法分离纯化病原菌,观察其形态学特征,结合其 rDNA-ITS 序列分析对病原菌进行分子鉴定^[8]。

1.2 试验方法

1.2.1 萜类化合物抑菌活性的测定

采用菌丝生长速率法测定萜类化合物的抑菌活性。在无菌条件下,将灭菌的 PDA 培养基(马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 15 g、纯净水 1 000 mL)冷却至 50℃左右,将 40 mg 萜类化合物加入 100 mL 培养基中,配成浓度为 400 μg/mL 的混合物,充分摇匀,倒入直径 9 cm 的培养皿中,每皿大约 20 mL。用 6 mm 的打孔器在培养好的供试菌菌落边缘打取长势相同的菌饼接入培养皿中央,每皿一枚,3 次重复,以 PDA 为空白对照。倒置培养,培养条件为 28℃。待对照长满培养皿后,用十字交叉法测量菌落直径,计算萜类化合物对供试菌的抑制率。

1.2.2 不同浓度萜类化合物抑菌活性的测定

将 1.2.1 测定的抑菌率大于 50% 的萜类化合物进行不同浓度梯度活性测定,浓度梯度为 50、100、200、400 μg/mL,方法同 1.2.1。

1.2.3 数据处理

试验数据处理采用 Excel 2010 和 SPSS 19.0 统计分析软件。抑菌率用 SPSS 软件进行单因素方差分析,采用 Duncan 氏新复极差法进行差异多重比较($P < 0.05$)。IC₅₀ 利用 SPSS 软件中回归分析的 Probit 进行计算。

抑菌率(%) = [(对照菌落直径 - 处理菌落直径) / 对照菌落直径 - 菌饼直径] × 100。

2 结果与分析

2.1 13 种萜类化合物对两种病菌菌丝生长的抑制作用

以菌丝生长速率法测定 13 种萜类化合物对胶孢

炭疽菌和链格孢菌丝生长的抑制作用。结果(表 1)表明除薄荷酮、苧酮和香茅醛对胶孢炭疽菌无抑菌活性;小茴香酮、薄荷酮和香芹酮对链格孢无抑菌活性外,其他精油对两种病菌均具有抑制活性,其中丁香酚和香芹酚的抑菌效果最好,对 2 种病原菌的抑菌率均为 100%。其次为异丁香酚、枯茗醛和百里香酚。

表 1 13 种萜类化合物(400 μg/mL)对两种病菌的抑菌活性¹⁾

Table 1 Antifungal activity of 13 terpenoid compounds (400 μg/mL) against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Alternaria* sp.

化合物 Compound	平均抑菌率±标准误/% Average inhibition rate±SE	
	胶孢炭疽菌 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	链格孢 <i>Alternaria</i> sp.
丁香酚 Eugenol	(100±0.00)a	(100±0.00)a
百里香酚 Thymol	(62.18±0.44)c	(61.37±0.97)d
香芹酚 Carvacrol	(100±0.00)a	(100±0.00)a
异丁香酚 Isoeugenol	(100±0.00)a	(84.54±0.89)b
苧酮(-)-Camphor	(0.00±0.00)h	(2.60±0.16)h
小茴香酮(-)-Fenchone	(3.91±0.44)g	(0.00±0.00)i
马鞭草烯酮(-)-Verbenone	(36.17±0.30)e	(2.10±1.37)h
长叶薄荷酮(+)-Pulegone	(38.85±0.70)d	(44.27±0.14)f
香芹酮(-)-Carvone	(4.19±0.15)g	(0.00±0.00)i
薄荷酮(-)-Menthone	(0.00±0.00)h	(0.00±0.00)i
柠檬醛 Citral	(23.49±0.24)f	(50.46±0.73)e
香茅醛 Citronellal	(0.00±0.00)h	(16.63±0.82)g
枯茗醛 Cuminaldehyde	(65.56±0.51)b	(66.67±0.59)c

1) 同列不同字母代表差异显著($P < 0.05$)。

The different letters in the same column represent significant difference ($P < 0.05$).

2.2 优选出的 5 种萜类化合物对两种病菌的 IC₅₀

根据 2.1 结果,香芹酚、异丁香酚等 5 种萜类化合物在浓度 400 μg/mL 时具有较好的抗病菌活性,为了进一步探索其抑菌活性,将选出来的 5 种萜类化合物进行浓度梯度活性试验,测定其对胶孢炭疽菌和链格孢的抑菌率,结果(图 1~2)表明:这 5 种萜类化合物对胶孢炭疽菌菌丝生长抑制活性为:香芹酚 > 丁香酚 > 异丁香酚 > 枯茗醛 > 百里香酚,其对应的 IC₅₀(表 2)分别为 40.89、42.95、88.86、170.58、348.56 μg/mL。经 5 种萜类化合物不同浓度梯度处理后菌落生长情况见图 3。精油对链格孢菌丝生长抑制活性为:香芹酚 > 异丁香酚 > 丁香酚 > 枯茗醛 > 百里香酚,其对应的 IC₅₀ 分别为 18.19、22.43、114.64、339.35、384.65 μg/mL。

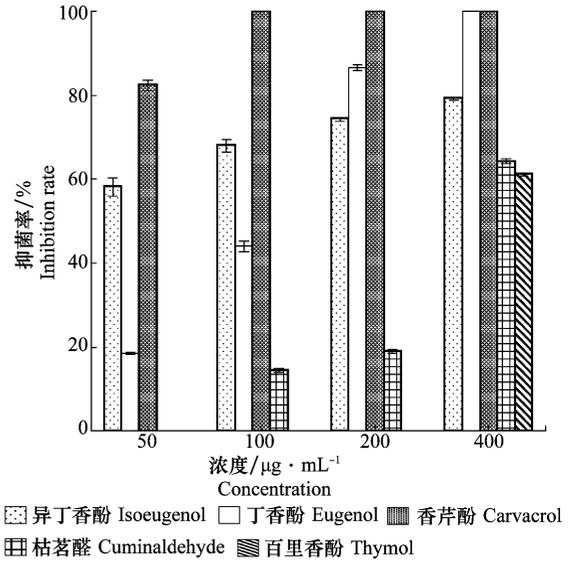
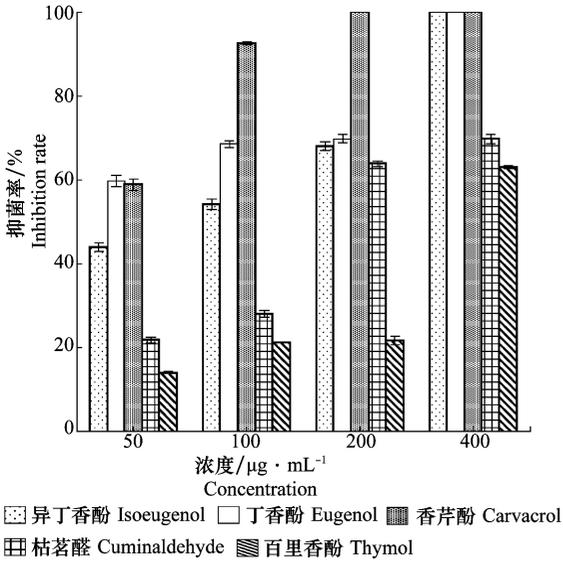


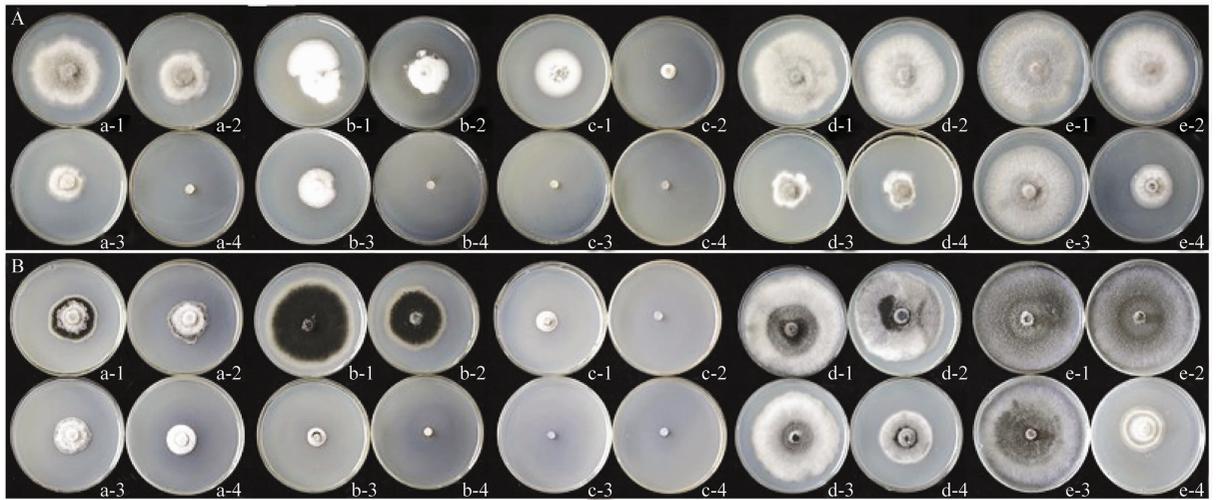
图 1 5 种萜类化合物对胶孢炭疽菌的抑菌活性
Fig. 1 Antifungal activity of five terpenoid compounds against *Colletotrichum gloeosporioides*

图 2 5 种萜类化合物对链格孢的抑菌活性
Fig. 2 Antifungal activity of five terpenoid compounds against *Alternaria* sp.

表 2 5 种萜类化合物对 2 种病原菌的半数抑制浓度

Table 2 IC₅₀ value of five terpenoid compounds on the two pathogens

化合物 Compound	胶孢炭疽菌 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>		链格孢 <i>Alternaria</i> sp.	
	IC ₅₀ /μg · mL ⁻¹	χ ²	IC ₅₀ /μg · mL ⁻¹	χ ²
异丁香酚 Isoeugenol	88.86(62.46~110.45)	21.19	22.43(8.63~37.02)	2.49
丁香酚 Eugenol	42.95(11.56~69.23)	36.57	114.64(107.70~121.72)	1.24
香芹酚 Carvacrol	40.89(32.48~47.09)	17.58	18.19(4.00~30.48)	26.26
枯茗醛 Cuminaldehyde	170.58(141.23~210.15)	23.19	339.35(305.52~382.79)	32.40
百里香酚 Thymol	348.56(310.27~365.87)	13.41	384.65(368.08~392.90)	1.60



A: 胶孢炭疽菌; B: 链格孢; a: 异丁香酚; b: 丁香酚; c: 香芹酚; d: 枯茗醛; e: 百里香酚; 1: 50 μg/mL; 2: 100 μg/mL; 3: 200 μg/mL; 4: 400 μg/mL
A: *Colletotrichum gloeosporioides*; B: *Alternaria* sp. a: Isoeugenol; b: Eugenol; c: Carvacrol; d: Cuminaldehyde; e: Thymol; 1: 50 μg/mL; 2: 100 μg/mL; 3: 200 μg/mL; 4: 400 μg/mL

图 3 5 种萜类化合物不同浓度对胶孢炭疽菌和链格孢的抑菌活性

Fig. 3 Antifungal activity of five terpenoid compounds at different concentrations on the *Colletotrichum gloeosporioides* and *Alternaria* sp.

3 讨论

本文研究了 13 种萜类化合物的抑菌活性,结果

表明:香芹酚、丁香酚、异丁香酚、枯茗醛、百里香酚对两种病原菌的抑菌活性较好,其中抑菌活性最好的是香芹酚。

香芹酚,又名香芹芥酚,它是百里香油、牛至油、山地椒油等植物提取物的主要成分。因其具有抑菌、杀虫、抗氧化等作用^[9-11],引起人们的关注。王新伟等^[12-13]采用纸片扩散法和双倍稀释法研究发现香芹酚对大肠杆菌 *Escherichia coli* 和金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、面包酵母 *Saccharomyces cerevisiae*、黑曲霉 *Aspergillus niger* 均有明显的抑制作用。Ultee 等^[14]研究发现香芹酚可以改变枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 细胞膜中脂肪酸的结构和比例,从而抑制其生长。香芹酚不但对植物病害具有一定的抑制活性,对植物虫害同样具有活性,如王玲等^[15]研究发现香芹酚对黏虫有较好的毒杀活性,用其处理 24 h 后的半致死浓度(LC₅₀)为 12.7 mg/L。张静等^[16]研究发现香芹酚对朱砂叶螨有较强的毒杀活性,在供试浓度为 1 g/L 时,处理 24 h 后其校正死亡率达到 100%,还可以抑制朱砂叶螨产卵,产卵抑制率高达 87.95%。

本文首次发现香芹酚对胶孢炭疽菌、链格孢具有抑制活性,这不仅为下一步研究其抑菌机制和作用方式奠定基础,也为将香芹酚开发成天然杀菌剂应用于农业生产实践提供理论依据。

参考文献

- [1] 高芬, 吴元华. 链格孢属(*Alternaria*)真菌病害的生物防治研究进展[J]. 植物保护, 2008, 34(3): 1-6.
- [2] 刘晓云, 景耀, 杨俊秀. 植物炭疽菌研究文献综述[J]. 西北林学院学报, 1995(4): 105-111.
- [3] 胡林峰, 许明录, 朱红霞. 植物精油抑菌活性研究进展[J]. 天
- [6] 牛立新. 世界葡萄种质资源研究概况[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 1994(3): 18-20.
- [7] 贺普超. 葡萄学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 272-287.
- [8] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1979: 124-136.
- [9] 贺普超, 王国英. 我国葡萄野生种霜霉病抗性的调查研究[J]. 园艺学报, 1986, 13(1): 12-21.
- [10] 农业部农药检定所生测室. 农药田间药效试验准则(二)第 122 部分: 杀菌剂防治葡萄霜霉病[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.
- [11] 刘会宁, 吴广宇, 赵耀华. 几个鲜食葡萄品种霜霉病抗性的鉴定[J]. 长江大学学报(自然版)农学卷, 2007, 4(2): 19-22.
- [12] 刘延琳, 张振文, 贺普超. 葡萄对霜霉病的抗病性机制[J]. 葡萄栽培与酿酒, 1997(2): 33-36.
- [13] 刘延琳, 贺普超. 两种葡萄霜霉病抗性鉴定标准的分析比较

然产物研究与开发, 2011, 23(2): 384-391.

- [4] 王巨媛, 翟胜. 植物精油应用进展及开发前景展望[J]. 江苏农业科学, 2010(4): 1-3.
- [5] 李永刚, 文景芝, 郝中娜. 植物源杀菌剂的研究现状与展望[J]. 东北农业大学学报, 2002, 33(2): 198-202.
- [6] 王树桐, 曹克强, 张凤巧, 等. 中药丁香提取物对番茄灰霉病菌抑制作用及生防效果[J]. 植物病理学报, 2005, 35(6): 91-94.
- [7] Di Vaio C, Graziani G, Gaspari A, et al. Essential oils content and antioxidant properties of peel ethanol extract in 18 lemon cultivars [J]. Scientia Horticulturae, 2010, 126(1): 50-55.
- [8] 史红安, 傅本重, 张志林, 等. 侵染油茶的两病原菌的鉴定及其生物学特性研究[J]. 湖北农业科学, 2015(23): 5908-5911.
- [9] Lambert R J, Skandamis P N, Coote P J, et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol [J]. Journal of Applied Microbiology, 2001, 91(3): 453-462.
- [10] Chami N, Bennis S, Chami F, et al. Study of anticandidal activity of carvacrol and eugenol *in vitro* and *in vivo* [J]. Oral Microbiology & Immunology, 2005, 20(2): 106-111.
- [11] 王新伟, 崔言开, 田双起, 等. 牛至油、香芹酚、柠檬醛和肉桂醛的抗氧化性能研究[J]. 食品工业科技, 2013, 14(34): 311-313.
- [12] 王新伟, 刘欢, 魏静, 等. 牛至油、香芹酚、柠檬醛和肉桂醛抑菌作用研究[J]. 食品工业, 2010(5): 13-16.
- [13] 王新伟, 杜会云, 宋玉函, 等. 牛至油、香芹酚、柠檬醛和肉桂醛抗真菌研究[J]. 食品科技, 2011, 36(2): 193-196.
- [14] Ultee A, Kets E P W, Alberda M, et al. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol [J]. Archives of Microbiology, 2000, 174(4): 233-238.
- [15] 王玲, 谌晓洪. 香芹酚对粘虫的毒杀活性研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(16): 8488-8490.
- [16] 张静, 冯岗. 11 种丙基酚类物质对朱砂叶螨的杀螨活性[J]. 中国农学通报, 2010, 26(17): 285-288.

(责任编辑: 杨明丽)

(上接 182 页)

- [6] 牛立新. 世界葡萄种质资源研究概况[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 1994(3): 18-20.
- [7] 贺普超. 葡萄学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 272-287.
- [8] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1979: 124-136.
- [9] 贺普超, 王国英. 我国葡萄野生种霜霉病抗性的调查研究[J]. 园艺学报, 1986, 13(1): 12-21.
- [10] 农业部农药检定所生测室. 农药田间药效试验准则(二)第 122 部分: 杀菌剂防治葡萄霜霉病[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.
- [11] 刘会宁, 吴广宇, 赵耀华. 几个鲜食葡萄品种霜霉病抗性的鉴定[J]. 长江大学学报(自然版)农学卷, 2007, 4(2): 19-22.
- [12] 刘延琳, 张振文, 贺普超. 葡萄对霜霉病的抗病性机制[J]. 葡萄栽培与酿酒, 1997(2): 33-36.
- [13] 刘延琳, 贺普超. 两种葡萄霜霉病抗性鉴定标准的分析比较
- [14] 张眉, 辛相启, 吴斌, 等. 山东葡萄霜霉病菌致病力分化及亲缘关系研究[J]. 山东农业科学, 2015, 47(4): 95-99.
- [15] 贾姝, 赵奎华, 刘长远, 等. 辽宁地区葡萄霜霉病菌 ITS 序列测定与遗传多样性分析[J]. 沈阳农业大学学报, 2014, 45(1): 19-23.
- [16] 吉丽丽, 李海强, 韩宏伟, 等. 不同葡萄品种对霜霉病的抗性鉴定[J]. 新疆农业科学, 2010, 47(12): 2463-2468.
- [17] 沙月霞, 王国珍, 樊仲庆. 不同酿酒葡萄品种对霜霉病的抗性分类[J]. 西北农业学报, 2006, 15(5): 114-117.
- [18] 林玲, 黄羽, 卢江, 等. 南方湿热地区不同葡萄品种霜霉病抗性鉴定[J]. 西北农业学报, 2013, 22(2): 136-140.
- [19] 张振文. 葡萄品种学[M]. 西安: 西安地图出版社, 2000: 30-51.
- [20] 乔宝营, 侯殿明, 孙冬梅, 等. 部分鲜食葡萄品种霜霉病抗性田间调查[J]. 植物保护, 2008, 34(4): 125-128.

(责任编辑: 杨明丽)