

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

侯辉宇 李 敏 李 爽 杜鹏强 赵 特* 周 琳*

(河南农业大学植物保护学院, 河南省新型农药创制与应用重点实验室,

河南省绿色农药创制工程技术研究中心, 郑州 450002)

摘要: 为评价牛至精油及其2种主要成分香芹酚和百里酚在植物真菌病害防治方面的应用前景, 采用菌丝生长速率法和孢子萌发法测定3种物质对16种植物病原真菌菌丝生长和孢子萌发的抑制活性, 并采用黄瓜子叶法测定其对黄瓜灰霉病的防治效果。结果表明, 牛至精油在500 mg/L浓度处理下可完全抑制番茄早疫病菌 *Alternaria solani*、黄瓜灰霉病菌 *Botrytis cinerea* 和小麦根腐病菌 *Bipolaris sorokiniana* 等12种植物病原真菌的菌丝生长, 对棉花黄萎病菌 *Verticillium dahliae* 的菌丝生长抑制率也达到97.66%。牛至精油对这13种病原真菌的 EC_{50} 在83.09~236.58 mg/L之间, 香芹酚和百里酚对这13种病原真菌的毒力均高于牛至精油, 其中香芹酚对黄瓜灰霉病菌、油菜菌核病菌 *Sclerotinia sclerotiorum*、小麦全蚀病菌 *Gaeumannomyces graminis*、棉花黄萎病菌和小麦茎基腐病菌 *Fusarium pseudograminearum* 菌丝生长的毒力较强, EC_{50} 分别为9.09、22.45、24.28、28.40和28.80 mg/L; 百里酚对黄瓜灰霉病菌和小麦全蚀病菌菌丝生长的毒力较强, EC_{50} 分别为21.32 mg/L和27.08 mg/L。香芹酚和百里酚对棉花黄萎病菌、玉米大斑病菌 *Setosphaeria turcica*、苦瓜枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *momordicae*、黄瓜灰霉病菌和黄瓜炭疽病菌 *Colletotrichum orbiculare* 的孢子萌发亦有较强毒力, 其 EC_{50} 为3.78~289.07 mg/L。1 000 mg/L牛至精油对黄瓜灰霉病的预防效果与400 mg/L嘧霉胺悬浮剂的预防效果无显著差异; 500 mg/L百里酚对黄瓜灰霉病的预防效果和治疗效果均与400 mg/L嘧霉胺悬浮剂的效果相当, 而香芹酚的治疗效果显著优于400 mg/L嘧霉胺悬浮剂。表明牛至精油及其主要成分香芹酚和百里酚的抑菌谱广且活性强, 具有作为植物源杀菌剂的开发应用潜力。

关键词: 牛至精油; 香芹酚; 百里酚; 植物病原真菌; 抑菌作用

Inhibitory activities of *Origanum vulgare* essential oil, and its main components carvacrol and thymol against 16 plant pathogenic fungi

HOU Huiyu LI Min LI Shuang DU Pengqiang ZHAO Te* ZHOU Lin*

(Henan Research Center of Green-Pesticide Technology and Engineering, Henan Key Laboratory of Creation and Application of Novel Pesticides, College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, Henan Province, China)

Abstract: To evaluate the application potential of *Origanum vulgare* essential oil (OVEO) and its two main components, carvacrol and thymol, in the control of plant fungal diseases, the effects of OVEO, carvacrol and thymol on mycelium growth and spore germination of 16 plant pathogenic fungi were conducted *in vitro*. Their control efficacy on grey mould was evaluated on cucumber cotyledons. The results showed that 500 mg/L OVEO could completely inhibit the mycelial growth of 12 plant pathogenic

基金项目: 国家自然科学基金(31371962), 国家重点研发计划(2017YFD0201704), 河南省科技创新人才基金(134100510009)

* 通信作者 (Authors for correspondence), E-mail: tezhao@126.com, zhoulinhenau@163.com

收稿日期: 2020-01-16

fungi, such as *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea* and *Bipolaris sorokiniana*, and the inhibition rate against *Verticillium dahlia* reached up to 97.66%. The EC_{50} values of OVEO against the above 13 tested fungi were 83.09–236.58 mg/L, and the toxicity of carvacrol and thymol against the mycelial growth of the 13 fungi was higher than that of OVEO. Carvacrol had the strongest toxicity to the mycelial growth of *B. cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Gaeumannomyces graminis*, *V. dahlia* and *Fusarium pseudograminearum* with an EC_{50} value of 9.09, 22.45, 24.28, 28.40 and 28.80 mg/L, respectively. Meanwhile, thymol had the strongest toxicity to the mycelial growth of *B. cinerea* and *G. graminis* with an EC_{50} value of 21.32 mg/L and 27.08 mg/L, respectively. The EC_{50} values of carvacrol and thymol against the spore germination of *V. dahlia*, *Setosphaeria turcica*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *momordicae*, *B. cinerea* and *Colletotrichum orbiculare* ranged from 3.78 mg/L to 289.07 mg/L. On the cucumber cotyledons, the protective efficacy of 1 000 mg/L OVEO was not significantly different from that of 400 mg/L pyrimethanil. The protective and therapeutic efficacies of 500 mg/L thymol were equivalent to that of 400 mg/L pyrimethanil, while the therapeutic efficacy of 500 mg/L carvacrol was significantly higher than that of the control fungicide 400 mg/L pyrimethanil. Therefore, OVEO, carvacrol and thymol have great application potential as plant-derived fungicides in controlling plant diseases.

Key words: *Origanum vulgare* essential oil; carvacrol; thymol; plant pathogenic fungi; antifungal activity

从天然产物中寻找先导化合物,并对其进行人工合成和修饰合成以开发更高活性的化合物,是新农药创制的主要途径之一(王铁楠等,2018)。生产上使用的主要农药,如拟除虫菊酯类和氨基甲酸酯类等杀虫剂(徐汉虹,2018),乙蒜素、“银果”和“银泰”等杀菌剂(孟昭礼,2004),以及环庚草醚、磺草酮和三氟羧草醚等除草剂,均源自植物中的先导化合物(张兴,2011)。目前我国登记的苦参碱、苦皮藤素、藜芦碱、蛇床子素、大黄素甲醚、香芹酚和丁子香酚等亦从植物中提取(张兴,2011)。可见,植物源天然产物是创制新农药的重要资源。

牛至 *Origanum vulgare* 为唇形科牛至属多年生半灌木或草本植物,广泛分布于我国华北、西北及长江以南地区(陈伟球等,1977),具有抗菌、消炎、镇痛以及调节免疫功能等多种作用(韩飞等,2015)。牛至精油是从牛至全株中提取的具有特殊芳香气味的挥发油,具有抑菌、抗氧化和杀虫等多种生物活性,目前在国内外医学和食品领域的研究与应用较多(Gomez et al., 2018; Lu et al., 2018; Xie et al., 2019)。笔者前期筛选发现牛至精油对多种植物病原真菌具有较强的抑制活性,并采用气相色谱-质谱联用仪分析鉴定出牛至精油的主要化学成分为香芹酚和百里酚(Hou et al., 2020)。目前,关于牛至精油及其主要化学成分香芹酚和百里酚抗植物病原真菌的研究报道较少,且多集中于对采后病害病原菌的抑制活性测定上,如 Elshafie et al. (2015) 通过菌丝生长速率法测定发现牛至精油中的百里酚、香芹酚、芳樟醇

和反式石竹烯对核果类果实采前和采后3种褐腐病原菌核果链核盘菌 *Monilinia laxa*、美澳型核果褐腐病菌 *M. fructicola* 和果生链核盘菌 *M. fructigena* 具有较强的离体活性,并采用果实针刺法评价了其桃果实褐腐病的防治效果;Barreto et al. (2016) 等发现牛至精油与食用壳聚糖联合涂层对2种番茄果实采后霉菌黑曲霉 *Aspergillus niger* 和匍枝根霉 *Rhizopus stolonifer* 具有显著的抑制活性,并能降低樱桃番茄果实贮藏期黑霉病和软腐病的发病率;黄文部等(2018)通过体外抑菌和活体抑菌试验测试了牛至精油对鲜切西兰花贮藏期易感病菌链格孢 *Alternaria alternata* 的抑制效果。

为进一步评价牛至精油及其主要成分香芹酚和百里酚在植物真菌病害防治方面的应用前景,本研究采用菌丝生长速率法、孢子萌发法和黄瓜子叶法测定3种物质对多种重要植物病原真菌的抑制活性,以期创制新型植物源杀菌剂和寻找杀菌剂先导化合物提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植物病原真菌和黄瓜:番茄茎枯病菌 *Alternaria alternata*、番茄早疫病病菌 *Alternaria solani*、黄瓜灰霉病菌 *Botrytis cinerea*、小麦根腐病菌 *Bipolaris sorokiniana*、苹果炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides*、黄瓜炭疽病菌 *Colletotrichum orbiculare*、黄瓜褐斑病菌 *Corynespora cassiicola*、小麦赤霉病

菌 *Fusarium graminearum*、黄瓜枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*、苦瓜枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *momordicae*、棉花枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*、小麦茎基腐病菌 *Fusarium pseudograminearum*、小麦全蚀病菌 *Gaeumannomyces graminis*、油菜菌核病菌 *Sclerotinia sclerotiorum*、玉米大斑病菌 *Setosphaeria turcica* 和棉花黄萎病菌 *Verticillium dahliae* 均由河南省新型农药创制与应用重点实验室提供。黄瓜品种为露地王,购自郑州郑研种苗科技有限公司;在用海绵保湿的灭菌培养皿内均匀放置3粒黄瓜种子进行培养,2周后选取长势均匀的黄瓜幼苗供试。

供试药剂及试剂:牛至精油,江西雪松天然药用油有限公司;99% 香芹酚(carvacrol)和98.5% 百里酚(thymol),美国 Sigma-Aldrich 公司;400 mg/L 噻霉胺(pyrimethanil)悬浮剂,拜耳作物科学(中国)有限公司。本试验所用试剂均为国产分析纯。

培养基:马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基:土豆200 g、葡萄糖20 g、琼脂16 g,加无菌水定容至1 L;马铃薯蔗糖琼脂(potato saccharose agar, PSA)培养基:土豆200 g、蔗糖20 g、琼脂16 g,加无菌水定容至1 L。

仪器:RXZ型智能人工气候箱、GXZ型智能光照培养箱,宁波江南仪器厂;AC100V-240V 50/60HZ 光学显微镜,上海缔伦光学仪器有限公司;Eppendorf 5424R 冷冻离心机,德国 Eppendorf 股份公司。

1.2 方法

1.2.1 牛至精油对16种病原真菌抑制活性的测定

采用菌丝生长速率法(慕立义等,1994)测定。用含0.5%丙酮和0.5%吐温-80的无菌水将牛至精油分别配制成浓度为5 g/L的母液。取1 mL母液和9 mL PDA培养基于直径9 cm的培养皿中混匀,冷却凝固后制成含药培养基,使牛至精油终浓度为500 mg/L;以含0.05%丙酮和0.05%吐温-80的无菌水为溶剂制作对照培养基。将16种供试病原真菌于(25±1)℃光照培养箱中黑暗培养3 d后,用直径5 mm打孔器在菌落边缘打制菌碟,并反接于含药培养基中,然后置于(25±1)℃下暗培养6 d后采用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。菌丝生长抑制率=[(对照菌落直径-菌碟直径)-(处理菌落直径-菌碟直径)]/(对照菌落直径-菌碟直径)×100%。

1.2.2 牛至精油及其主要成分对病原真菌的毒力测定

为进一步明确牛至精油及其主要成分香芹酚和

百里酚对植物病原真菌的抑制活性,基于1.2.1结果,分别测定3种物质对其中受抑制程度严重的13种供试病原真菌的毒力。首先将3种物质配制成所需系列浓度的含药培养基,方法同1.2.1,其中牛至精油浓度为50、100、150、200、250、300、350、400 mg/L,香芹酚终浓度为2.5、5、10、20、50、100、150、200 mg/L,百里酚终浓度为10、20、40、60、80、120、160、200 mg/L。然后用直径5 mm打孔器在活化3~5 d的13种供试病原真菌菌落边缘打制菌碟,并反接于含药培养基中,置于(25±1)℃光照培养箱中黑暗培养。以含0.05%丙酮和0.05%吐温-80的无菌水为溶剂制作对照培养基,每浓度处理3次重复。当对照菌落直径长至7 cm以上时,用十字交叉法测量各处理的菌落直径,计算菌丝生长抑制率,并根据概率值分析法求得毒力回归方程和抑制中浓度 EC_{50} (慕立义等,1994)。

1.2.3 香芹酚和百里酚对病原真菌分生孢子的毒力测定

基于1.2.2结果,从中选择5种植物病原真菌番茄灰霉病菌、黄瓜炭疽病菌、苦瓜枯萎病菌、玉米大斑病菌和棉花黄萎病菌,采用凹玻片法测定香芹酚和百里酚对其分生孢子萌发的影响。首先用直径5 mm的打孔器分别在PDA培养基上培养3 d的供试病原真菌菌落边缘打取菌碟,反接于PDA平板中央,于25℃黑暗培养7~12 d长出分生孢子后,倒入无菌水,用灭菌棉签轻轻将表面的分生孢子刮下,重复洗脱3次后,用4层纱布过滤。将收集到的分生孢子悬浮液以1 000 r/min离心5 min,去上清液,用无菌水将分生孢子悬浮液浓度稀释至 $10^5 \sim 10^6$ 个/mL。分别将香芹酚和百里酚配制成浓度为2.5、5、10、20、40、80、160、320 mg/L和10、20、50、100、200、300、400、500 mg/L的处理药液,取0.5 mL药液与0.5 mL分生孢子悬浮液混匀,用移液枪吸取60 μL滴于凹玻片上,然后放入保湿培养皿中并置于28℃培养箱中黑暗培养。以含0.05%丙酮和0.05%吐温80的无菌水为溶剂对照,每浓度处理重复3次。每隔2 h观察1次,当对照分生孢子萌发率超过85%时,检查所有处理分生孢子的萌发情况,每重复观察不少于200个分生孢子,统计孢子萌发率,并根据概率值分析法求出毒力回归方程(慕立义等,1994)。

1.2.4 牛至精油及其主要成分对黄瓜灰霉病防效测定

为验证牛至精油及其主要成分香芹酚和百里酚对重要植物病害的防治效果,采用黄瓜子叶法(陈治芳等,2011)测定3种物质对黄瓜灰霉病的预防效果和治疗效果。预防效果试验中牛至精油、香芹酚和百里酚处理浓度均设为500 mg/L和1 000 mg/L,以

400 mg/L 噻霉胺悬浮剂为药剂对照,以含 0.05% 丙酮和 0.05% 吐温-80 的无菌水为溶剂对照。每浓度处理 9 个重复,3 株黄瓜幼苗 6 片子叶为 1 个重复。将各处理药液分别均匀喷洒在黄瓜子叶上,以药液开始下滴为度。待药液阴干后,每片子叶中部接 1 块供试病原真菌菌碟,菌碟制备方法同 1.2.1,然后置于温度(25±1)℃、相对湿度>85%、光照 12 h/黑暗 12 h 的人工气候箱内培养 48 h 后,测量各处理黄瓜子叶上的病斑直径,并计算预防效果。治疗效果试验中药剂处理和试验重复设置均与预防效果试验相同,将培育 2 周的黄瓜幼苗子叶接种供试病原真菌菌碟后放入上述条件的人工气候箱内培养 24 h 后取出,然后分别将上述不同浓度药液喷于子叶上,以药液开始下滴为度,待药液阴干后放入人工气候箱中继续培养 48 h 后测量各处理黄瓜子叶上的病斑直径,并计算治疗效果。预防效果/治疗效果=(对照病斑直径-处理病斑直径)/对照病斑直径×100%。

表 1 牛至精油处理 6 d 后对 16 种植物病原真菌菌丝生长的抑制率

Table 1 Inhibition rate of mycelium growth of 16 plant pathogenic fungi by <i>Origanum vulgare</i> essential oil in 6 d %			
植物病原真菌 Pathogenic fungus	抑制率 Inhibition rate	植物病原真菌 Pathogenic fungus	抑制率 Inhibition rate
番茄茎枯病菌 <i>Alternaria alternata</i>	78.49±1.79	黄瓜枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	80.93±15.97
番茄早疫病菌 <i>Alternaria solani</i>	100.00±0.00	苦瓜枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>momordicae</i>	100.00±0.00
黄瓜灰霉病菌 <i>Botrytis cinerea</i>	100.00±0.00	棉花枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	100.00±0.00
小麦根腐病菌 <i>Bipolaris sorokiniana</i>	100.00±0.00	小麦茎基腐病菌 <i>Fusarium pseudograminearum</i>	100.00±0.00
苹果炭疽病菌 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	72.16±3.36	小麦全蚀病菌 <i>Gaeumannomyces graminis</i>	100.00±0.00
黄瓜炭疽病菌 <i>Colletotrichum orbiculare</i>	100.00±0.00	油菜菌核病菌 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	100.00±0.00
黄瓜褐斑病菌 <i>Corynespora cassiicola</i>	100.00±0.00	玉米大斑病菌 <i>Setosphaeria turcica</i>	100.00±0.00
小麦赤霉病菌 <i>Fusarium graminearum</i>	100.00±0.00	棉花黄萎病菌 <i>Verticillium dahliae</i>	97.66±0.00

牛至精油浓度为 500 mg/L; 表中数据为平均数±标准差。The concentration of *O. vulgare* essential oil is 500 mg/L. Data are mean±SD.

2.2 牛至精油及其主要成分对 13 种病原真菌的毒力
牛至精油对小麦全蚀病菌和番茄早疫病菌菌丝生长的毒力最强,EC₅₀ 分别为 83.09 mg/L 和 98.33 mg/L, 对其余 11 种供试植物病原真菌的 EC₅₀ 在 132.07~236.58 mg/L 之间。香芹酚和百里酚对 13 种供试植物病原真菌菌丝生长的毒力均高于牛至精油,其中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

1.3 数据分析
试验数据采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,应用 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 牛至精油对 16 种植物病原真菌的抑制活性
500 mg/L 牛至精油处理 6 d 后可完全抑制番茄早疫病菌、黄瓜灰霉病菌、小麦根腐病菌、黄瓜炭疽病菌、黄瓜褐斑病菌、小麦赤霉病菌、苦瓜枯萎病菌、棉花枯萎病菌、小麦茎基腐病菌、小麦全蚀病菌、玉米大斑病菌和油菜菌核病菌共 12 种植物病原真菌的菌丝生长,抑制率达 100.00%;对棉花黄萎病菌菌丝生长的抑制率也达 97.66%;而对黄瓜枯萎病菌、番茄茎枯病菌和苹果炭疽病菌菌丝生长的抑制活性相对较弱,抑制率分别为 80.93%、78.49% 和 72.16% (表 1),因此选择除这 3 种植物病原真菌之外的其余 13 种植物病菌真菌进行后续试验。

毒力最强,EC₅₀ 分别为 9.09、22.45、24.28、28.40 和 28.80 mg/L,其次是对棉花枯萎病菌、黄瓜炭疽病菌和玉米大斑病菌的毒力,EC₅₀ 分别为 41.39、45.84 和 48.18 mg/L,对其余 5 种供试植物病原真菌的 EC₅₀ 在 54.81~130.15 mg/L 之间;百里酚对黄瓜灰霉病菌和小麦全蚀病菌菌丝生长的毒力最强,EC₅₀ 分别为 21.32 mg/L 和 27.08 mg/L,对玉米大斑病菌和黄瓜炭疽病菌的毒力次之,EC₅₀ 分别为 32.68 mg/L 和

40.33 mg/L, 对其余9种供试植物病原真菌的 EC_{50} 介于50.09~91.07 mg/L之间(表2)。

表2 牛至精油及其主要成分香芹酚和百里酚对13种植物病原真菌菌丝的毒力

Table 2 Toxicities of *Origanum vulgare* essential oil against mycelial growth of 13 plant pathogenic fungi

病原真菌 Pathogenic fungus	供试物质 Chemical	毒力回归方程 Regression equation	相关系数 r Correlation coefficient r	EC_{50} (95% FL)/(mg/L)
番茄早疫病菌 <i>Alternaria solani</i>	牛至精油 OVEO	$y=4.709x-4.383$	0.998	98.33(61.97–156.01)
	香芹酚 Carvacrol	$y=2.812x-0.304$	0.993	76.96(39.19–151.12)
	百里酚 Thymol	$y=3.898x-2.161$	0.994	68.70(40.03–117.89)
黄瓜灰霉病菌 <i>Botrytis cinerea</i>	牛至精油 OVEO	$y=1.610x+1.521$	0.950	144.85(58.07–337.72)
	香芹酚 Carvacrol	$y=1.970x+3.112$	0.993	9.09(3.96–20.85)
	百里酚 Thymol	$y=2.643x+1.488$	0.997	21.32(9.95–45.68)
黄瓜炭疽病菌 <i>Colletotrichum orbiculare</i>	牛至精油 OVEO	$y=4.910x-6.210$	0.977	191.76(135.89–270.61)
	香芹酚 Carvacrol	$y=3.127x-0.194$	0.974	45.84(23.96–87.71)
	百里酚 Thymol	$y=2.510x+0.970$	0.983	40.33(20.09–80.97)
黄瓜褐斑病菌 <i>Corynespora cassiicola</i>	牛至精油 OVEO	$y=6.366x-10.113$	0.971	236.58(179.47–311.86)
	香芹酚 Carvacrol	$y=5.626x-6.895$	0.949	130.15(97.82–173.18)
	百里酚 Thymol	$y=4.910x-3.791$	0.975	61.74(36.16–105.40)
小麦赤霉病菌 <i>Fusarium graminearum</i>	牛至精油 OVEO	$y=5.549x-6.769$	0.976	132.07(85.24–204.64)
	香芹酚 Carvacrol	$y=6.622x-7.462$	0.968	76.18(55.38–104.79)
	百里酚 Thymol	$y=3.538x-1.445$	0.996	66.33(35.96–122.35)
黄瓜枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	牛至精油 OVEO	$y=4.508x-5.556$	0.996	219.48(149.36–322.52)
	香芹酚 Carvacrol	$y=5.133x-5.585$	0.948	115.38(79.49–167.48)
	百里酚 Thymol	$y=3.166x-1.204$	0.992	91.07(56.01–148.08)
苦瓜枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>momordicae</i>	牛至精油 OVEO	$y=4.582x-4.776$	0.988	136.00(82.45–224.33)
	香芹酚 Carvacrol	$y=3.813x-1.630$	0.992	54.81(31.60–95.08)
	百里酚 Thymol	$y=2.373x+0.758$	0.973	61.28(31.05–120.96)
棉花枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	牛至精油 OVEO	$y=4.620x-4.998$	0.953	145.91(94.61–225.03)
	香芹酚 Carvacrol	$y=3.295x-0.325$	0.952	41.39(23.25–73.70)
	百里酚 Thymol	$y=5.135x-4.553$	0.991	72.52(42.35–124.19)
小麦茎基腐病菌 <i>Fusarium pseudograminearum</i>	牛至精油 OVEO	$y=4.966x-5.666$	0.937	140.54(91.47–215.94)
	香芹酚 Carvacrol	$y=4.032x-0.884$	0.982	28.80(13.55–61.23)
	百里酚 Thymol	$y=4.820x-3.987$	0.985	72.96(47.92–111.09)
小麦全蚀病菌 <i>Gaeumannomyces graminis</i>	牛至精油 OVEO	$y=4.473x-3.587$	0.990	83.09(56.63–121.93)
	香芹酚 Carvacrol	$y=7.275x-5.077$	0.870	24.28(18.16–32.45)
	百里酚 Thymol	$y=4.300x-1.161$	0.990	27.08(18.61–39.39)
油菜菌核病菌 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	牛至精油 OVEO	$y=4.399x-4.504$	0.948	144.68(94.50–221.51)
	香芹酚 Carvacrol	$y=4.776x-1.454$	0.970	22.45(13.16–38.30)
	百里酚 Thymol	$y=4.863x-4.160$	0.998	76.49(49.63–117.89)
玉米大斑病菌 <i>Setosphaeria turcica</i>	牛至精油 OVEO	$y=5.121x-5.916$	0.957	135.45(85.35–214.95)
	香芹酚 Carvacrol	$y=4.177x-2.023$	0.987	48.18(28.78–80.68)
	百里酚 Thymol	$y=3.799x-0.753$	0.999	32.68(17.37–61.47)
棉花黄萎病菌 <i>Verticillium dahliae</i>	牛至精油 OVEO	$y=5.134x-6.274$	0.990	157.05(86.59–284.85)
	香芹酚 Carvacrol	$y=2.719x+1.048$	0.998	28.40(11.03–73.09)
	百里酚 Thymol	$y=3.172x-0.391$	0.987	50.09(18.27–137.36)

OVEO: *Origanum vulgare* essential oil.

2.3 香芹酚和百里酚对5种病原真菌分生孢子的毒力

香芹酚和百里酚对5种植物病原真菌分生孢子萌发均有不同程度的抑制活性。香芹酚对棉花黄萎病菌、玉米大斑病菌、苦瓜枯萎病菌分生孢子萌发的毒力最强, EC_{50} 分别为3.78、23.41和30.09 mg/L;对

番茄灰霉病菌和黄瓜炭疽病菌分生孢子萌发的 EC_{50} 为174.64 mg/L和190.73 mg/L。百里酚亦对5种植物病原真菌分生孢子萌发具有较好的抑制作用, EC_{50} 介于111.54~289.07 mg/L之间(表3)。

表3 香芹酚和百里酚对5种植物病原真菌分生孢子萌发的毒力
Table 3 Toxicities of carvacrol and thymol against conidial germination of five plant pathogenic fungi

供试植物病原真菌 Pathogenic fungus	供试物质 Chemical	毒力回归方程 Regression equation	相关系数 r Correlation coefficient r	EC ₅₀ (95% FL)/(mg/L)
黄瓜灰霉病菌 <i>Botrytis cinerea</i>	香芹酚 Carvacrol	$y=7.644x-12.139$	0.973	174.64(150.61–202.52)
	百里酚 Thymol	$y=7.333x-11.476$	0.978	176.51(151.705–205.38)
黄瓜炭疽病菌 <i>Colletotrichum orbiculare</i>	香芹酚 Carvacrol	$y=4.184x-4.542$	0.979	190.73(142.38–255.50)
	百里酚 Thymol	$y=1.905x+0.311$	0.966	289.07(175.98–474.85)
苦瓜枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>momordicae</i>	香芹酚 Carvacrol	$y=0.753x+3.887$	0.954	30.09(8.26–109.60)
	百里酚 Thymol	$y=4.023x-4.356$	0.988	211.60(162.84–274.96)
玉米大斑病菌 <i>Setosphaeria turcica</i>	香芹酚 Carvacrol	$y=0.519x+4.289$	0.955	23.41(3.89–140.95)
	百里酚 Thymol	$y=1.793x+1.323$	0.977	111.54(57.57–216.08)
棉花黄萎病菌 <i>Verticillium dahliae</i>	香芹酚 Carvacrol	$y=1.902x+3.901$	0.997	3.78(1.95–7.32)
	百里酚 Thymol	$y=0.939x+2.970$	0.959	145.64(41.31–513.43)

2.4 牛至精油及其主要成分对黄瓜灰霉病的防效

当处理浓度为500 mg/L时,牛至精油对黄瓜灰霉病的预防效果和治疗效果分别为28.83%和11.98%,均显著低于药剂对照400 mg/L嘧霉胺悬浮剂的预防效果49.49%和治疗效果36.45%;香芹酚对黄瓜灰霉病的预防效果(37.76%)低于药剂对照,而治疗效果(46.24%)则显著高于药剂对照;百里酚对黄瓜灰霉病的的预防效果和治疗效果均与药剂对

照无显著差异。当处理浓度提高到1 000 mg/L时,牛至精油对黄瓜灰霉病的预防效果为46.35%,与400 mg/L嘧霉胺悬浮剂相当,但治疗效果不明显;香芹酚和百里酚对黄瓜灰霉病的治疗效果达64.28%和47.70%,均显著高于药剂对照的治疗效果36.45%,并以香芹酚的治疗效果最好;2种成分对黄瓜灰霉病的预防效果分别为51.86%和46.33%,与药剂对照的预防效果相当(表4)。

表4 牛至精油及其主要成分香芹酚和百里酚对黄瓜灰霉病的预防效果和治疗效果
Table 4 Protective and therapeutic efficacies of *Origanum vulgare* essential oil, carvacrol and thymol against cucumber gray mold caused by *Botrytis cinerea*

供试物质 Chemical	处理浓度 Concentration/ (mg/L)	预防试验 Prevention trial		治疗试验 Therapeutic trial	
		病斑直径/mm Patch diameter	预防效果/% Prevention efficacy	病斑直径/mm Patch diameter	治疗效果/% Therapeutic efficacy
牛至精油	500	5.60±0.68 b	28.83±2.74 e	8.78±0.56 b	11.98±2.31 e
<i>O. vulgare</i> essential oil	1 000	4.22±0.39 cd	46.35±2.02 bcd	7.55±0.38 c	24.25±2.06 d
香芹酚	500	4.87±0.52 c	37.76±3.25 de	5.33±0.41 ef	46.24±2.74 b
Carvacrol	1 000	3.75±0.85 d	51.86±4.43 ab	3.55±0.21 g	64.28±1.48 a
百里酚	500	4.65±0.54 c	40.61±3.14 cd	5.83±0.19 de	41.47±1.53 bc
Thymol	1 000	4.19±0.33 cd	46.33±2.61 bcd	5.21±0.53 f	47.70±2.19 b
嘧霉胺	400	3.92±0.81 d	49.49±4.64 bc	6.32±0.76 d	36.45±3.35 c
Pyrimethanil					
对照 Control	0	7.90±0.72 a	0.00±0.00 f	10.02±0.94 a	0.00±0.00 f

表中数据为平均数±标准误。同列不同字母表示经Duncan氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SE. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

3 讨论

已有研究表明,多种牛至属植物对植物病原菌具有较好的抑制作用。如500 mg/L冬马祖林*O. heracleoticum*精油可完全抑制采后植物病原真菌灰葡萄孢、黑曲霉和美澳型核果褐腐病菌的菌丝生长,1 000 mg/L浓度处理可完全抑制采后青霉*Penicillium expansum*的菌丝生长;而12 mg/L甜马祖林*O. majo-*

*rana*精油即对巨大芽胞杆菌*Bacillus megaterium*、密歇根棒状杆菌*Clavibacter michiganensis*、黄单胞杆菌*Xanthomonas campestris*和丁香假单胞菌*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*等采后植物病原细菌有抑制作用(Della Pepa et al., 2019);300 mg/L野马郁兰*O. compactum*精油可抑制采自水稻上的病原真菌如链格孢、稻平脐蠕孢*Bipolaris oryzae*、禾谷镰孢*F. graminearum*、木贼镰孢*F. equiseti*和轮枝镰孢

*F. verticillioides*的菌丝生长(Santamarina et al., 2015); 12.8 $\mu\text{g/mL}$ 奥勒冈 *O. syriacum* var. *bevanii* 精油及其 0.2 $\mu\text{g/mL}$ 挥发物均可完全抑制番茄灰葡萄孢的菌丝生长(Soylu et al., 2010)。牛至精油对链格孢和丁香假单胞菌亦有较好的抑制作用(Oliva Mde et al., 2015; 黄文部等, 2018)。本研究结果表明, 500 mg/L 牛至精油对 16 种植物病原真菌的菌丝生长抑制率达 72.16%~100.00%; 对其中 13 种植物病原真菌的 EC_{50} 为 83.09~236.58 mg/L; 1 000 mg/L 牛至精油对黄瓜灰霉病的预防效果与 400 mg/L 嘧霉胺相当。可见, 牛至精油对植物病原真菌的作用谱广, 且抑菌活性强, 在植物病害防治中具有较大的应用潜力。

目前已报道从采自不同地区的牛至植株中鉴定出酚类、萜烯类及其衍生物、脂肪酸类、黄酮和甾醇等 50 多种化合物, 且大多含有不同含量的香芹酚和百里酚(Rodriguez-Garcia et al., 2016; Khan et al., 2019)。Elshafie et al. (2015) 研究发现 500 mg/L 香芹酚和 500 mg/L 百里酚对引起桃褐腐病的 3 种植物病原真菌均具有强烈抑制效果; Abbaszadeh et al. (2014) 发现香芹酚和百里酚对黑曲霉、烟曲霉 *A. fumigatus*、黄曲霉 *A. flavus*、褐黄曲霉 *A. ochraceus*、链格孢、灰葡萄孢、枝孢菌 *Cladosporium* spp.、橘青霉 *Penicillium citrinum*、黄青霉 *P. chrysogenum*、尖镰孢 *F. oxysporum* 和米根霉 *Rhizopus oryzae* 共 11 种食品相关真菌的最小抑制浓度分别为 50~350 mg/L 和 100~500 mg/L。本研究结果表明, 香芹酚和百里酚对 13 种重要植物病原真菌菌丝生长的 EC_{50} 介于 9.09~130.15 mg/L 之间, 对其中 5 种真菌分生孢子萌发的 EC_{50} 为 3.78~289.07 mg/L; 500 mg/L 香芹酚对黄瓜灰霉病的治疗效果显著优于 400 mg/L 嘧霉胺悬浮剂, 500 mg/L 百里酚对黄瓜灰霉病的预防效果和治疗效果均与 400 mg/L 嘧霉胺悬浮剂相当。可见, 香芹酚和百里酚作为牛至精油中的主要抗菌活性成分, 既可进行直接开发利用, 亦可作为先导化合物用合成方法进行结构优化, 以期创制新农药。但关于香芹酚和百里酚是否具有协同增效作用亦值得进一步探讨。

不管是以天然产物为先导进行结构改造, 还是以有害生物新靶标为目标进行新农药开发, 了解药剂的作用机理及作用靶标是必不可少的。关于香芹酚和百里酚的药理作用已有较多研究(Taleb et al., 2018; Spyridopoulou et al., 2019), 有关其对植物病原真菌的作用机理鲜有报道。Zhou et al. (2018) 研究发现香芹酚和丁子香酚可增加匍枝根霉细胞膜透性, 导致细胞质、核酸和蛋白质泄漏; 香芹酚和百里

酚亦可使灰葡萄孢胞外 pH 和总脂质含量下降(Zhang et al., 2019); Zhang et al. (2018) 发现尖镰孢经百里酚处理后, 有关糖鞘脂生物合成和代谢的基因表达下调, 涉及抗氧化剂活性、几丁质生物合成和细胞壁修饰的基因表达上调, 证实了百里酚通过影响细胞壁和细胞膜生物合成基因而导致活性氧积累, 细胞壁、细胞膜的完整性被破坏。至今香芹酚和百里酚对植物病原真菌的作用靶标尚不明确。因此, 有必要对香芹酚和百里酚的作用机制开展深入研究, 这不仅有益于高效、安全的新农药开发, 也为基于作用靶标的新农药分子合理设计提供参考依据。

鉴于牛至精油具有对植物病原真菌抑制活性高、作用谱广, 且植物毒性较低(Elshafie et al., 2017) 和对哺乳动物无害(Llana-Ruiz-Cabello et al., 2017) 等特点, 牛至精油及其主要成分香芹酚和百里酚有望成为化学合成杀菌剂的替代药剂用于各种农作物、蔬菜和观赏植物等重要病害的综合治理, 但其应用关键技术, 如田间防效、制剂加工和安全性评价等尚需进一步研究。

参 考 文 献 (References)

- ABBASZADEH S, SHARIFZADEH A, SHOKRI H, KHOSRAVI AR, ABBASZADEH A. 2014. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. *Journal de Mycologie Medicale*, 24(2): e51-6
- BARRETO TA, ANDRADE SCA, MACIEL JF, ARCANJO NMO, MADRUGA MS, MEIRELES B, CORDEIRO AMT, SOUZA EL, MAGNANI M. 2016. A chitosan coating containing essential oil from *Origanum vulgare* L. to control postharvest mold infections and keep the quality of cherry tomato fruit. *Frontiers in Microbiology*, 7: 1724-1738
- CHEN WQ, RUAN YZ, FU SX. 1977. *Flora of China: Vol. 66, Angiospermae, Dicotyledoneae, Labiatae (II)*. Beijing: Science Press, pp. 247-248 (in Chinese) [陈伟球, 阮云珍, 傅书遐. 1977. 中国植物志: 第六十六卷, 被子植物门双子叶植物纲唇形科(二). 北京: 科学出版, pp. 247-248]
- CHEN ZF, WANG WQ, HAN XY, ZHANG XF, ZHAO JJ, MA ZQ. 2011. Fungicidal activity of new fungicides against *Botrytis cinerea* and their field efficacy against tomato grey mould. *Plant Protection*, 37(5): 193-195 (in Chinese) [陈治芳, 王文桥, 韩秀英, 张小风, 赵建江, 马志强. 2011. 新杀菌剂对番茄灰霉病菌的室内毒力及田间防效. *植物保护*, 37(5): 193-195]
- DELLA PEPA T, ELSHAFIE HS, CAPASSO R, DE FEO V, CAMELE I, NAZZARO F, SCOGNAMIGLIO MR, CAPUTO L. 2019. Antimicrobial and phytotoxic activity of *Origanum heracleoticum* and *O. majorana* essential oils growing in Cilento (Southern Italy). *Molecules*, 24(2576): 1-16
- ELSHAFIE HS, ARMENTANO MF, CARMOSINO M, BUFO SA,

- DE FEO V, CAMELE I. 2017. Cytotoxic activity of *Origanum vulgare* L. on hepatocellular carcinoma cell line HepG2 and evaluation of its biological activity. *Molecules*, 22(9): 1435
- ELSHAFIE HS, MANCINI E, SAKR S, DE MARTINO L, MATTIA CA, DE FEO V, CAMELE I. 2015. Antifungal activity of some constituents of *Origanum vulgare* L. essential oil against postharvest disease of peach fruit. *Journal of Medicinal Food*, 18(8): 929–934
- GOMEZ JV, TARAZONA A, MATEO-CASTRO R, GIMENO-ADELANTADO JV, JIMENEZ M, MATEO EM. 2018. Selected plant essential oils and their main active components, a promising approach to inhibit aflatoxigenic fungi and aflatoxin production in food. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 35(8): 1581–1595
- HAN F, CHEN Q, SHU JC, ZHAO ZD, HUANG Y, XU HL, YANG M. 2015. GC-MS analysis on volatile oil extracted from different parts of *Origanum vulgare* growing in Hubei Province. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 46(13): 1887–1891 (in Chinese) [韩飞, 陈泣, 舒积成, 赵志冬, 黄艺, 许汉林, 杨明. 2015. 湖北产牛至药材不同提取部位挥发油GC-MS分析. *中草药*, 46(13): 1887–1891]
- HOU HY, ZHANG XY, ZHAO T, ZHOU L. 2020. Effects of *Origanum vulgare* Linn. essential oil and its two main components, carvacrol and thymol, on the plant pathogen *Botrytis cinerea*. *PeerJ*, 8: e9626
- HUANG WB, MA WD, WEN H, ZENG Q, HE JL, QIN W. 2018. Isolation and identification of pathogens from fresh-cut broccoli during storage and their inhibition by plant essential oils. *Food Science*, 39(19): 241–246 (in Chinese) [黄文部, 马菀笛, 文豪, 曾茜, 何靖柳, 秦文. 2018. 鲜切西兰花贮藏期病原菌分离鉴定及植物精油对其抑制效果. *食品科学*, 39(19): 241–246]
- KHAN M, KHAN ST, KHAN M, MOUSA AA, MAHMOOD A, AL-KHATHLAN HZ. 2019. Chemical diversity in leaf and stem essential oils of *Origanum vulgare* L. and their effects on microbicidal activities. *AMB Express*, 9(1): 176
- LLANA-RUIZ-CABELLO M, MAISANABA S, PUERTO M, PICHARDO S, JOS A, MOYANO R, CAMEAN AM. 2017. A subchronic 90-day oral toxicity study of *Origanum vulgare* essential oil in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 101: 36–47
- LU M, DAI T, MURRAY CK, WU MX. 2018. Bactericidal property of oregano oil against multidrug-resistant clinical isolates. *Frontiers in Microbiology*, 9: 2329
- MENG ZL. 2004. *Ginkgo biloba* and its bionic fungicides. Beijing: China Science and Technology Press, pp. 50–189 (in Chinese) [孟昭礼. 2004. 银杏及其仿生杀菌剂. 北京: 中国科学技术出版社, pp. 50–189]
- MU LY, WU WJ, WANG KY. 1994. *Methods of chemical plant protection*. Beijing: China Agriculture Press, pp. 79–81 (in Chinese) [慕立义, 吴文君, 王开运. 1994. 植物化学保护研究方法. 北京: 中国农业出版社, pp. 79–81]
- OLIVA MDE L, CAREZZANO ME, GIULIANO M, DAGHERO J, ZYGADLO J, BOGINO P, GIORDANO W, DEMO M. 2015. Antimicrobial activity of essential oils of *Thymus vulgaris* and *Origanum vulgare* on phytopathogenic strains isolated from soybean. *Plant Biology*, 17(3): 758–765
- RODRIGUEZ-GARCIA I, SILVA-ESPINOZA BA, ORTEGA-RAMIREZ LA, LEYVA JM, SIDDIQUI MW, CRUZ-VALENZUELA MR, GONZALEZ-AGUILAR GA, AYALA-ZAVALA JF. 2016. Oregano essential oil as an antimicrobial and antioxidant additive in food products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(10): 1717–1727
- SANTAMARINA MP, ROSELLO J, SEMPERE F, GIMENEZ S, BLAZQUEZ MA. 2015. Commercial *Origanum compactum* Benth. and *Cinnamomum zeylanicum* Blume essential oils against natural mycoflora in Valencia rice. *Natural Product Research*, 29(23): 2215–2218
- SOYLU EM, KURT S, SOYLU S. 2010. *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. *International Journal of Food Microbiology*, 143(3): 183–189
- SPYRIDOPOULOU K, FITSIOU E, BOULOUKOSTA E, TIPTIRIKOURPETI A, VAMVAKIAS M, OREOPOULOU A, PAVASSILOPOULOU E, PAPPAS A, CHLICHIA K. 2019. Extraction, chemical composition, and anticancer potential of *Origanum onites* L. essential oil. *Molecules*, 24(14): 2612
- TALEB MH, ABDELTAWAB NF, SHAMMA RN, ABDELGAYED SS, MOHAMED SS, FARAG MA, RAMADAN MA. 2018. *Origanum vulgare* L. essential oil as a potential anti-acne topical nanoemulsion: *in vitro* and *in vivo* study. *Molecules*, 23(9): 2164
- WANG YN, ZHAO T, GAO F, DUAN PF, LIU XY, ZHOU L. 2018. Effects of *Litsea cubeba* essential oils on the growth and development of oomycete pathogen *Phytophthora capsici* and pepper blight. *Journal of Plant Protection*, 45(5): 1112–1120 (in Chinese) [王轶楠, 赵特, 高飞, 段鹏飞, 刘向阳, 周琳. 2018. 山苍子精油对辣椒疫霉生长发育的影响及对辣椒疫病的防效. *植物保护学报*, 45(5): 1112–1120]
- XIE YJ, HUANG QQ, RAO YQ, HONG L, ZHANG DY. 2019. Efficacy of *Origanum vulgare* essential oil and carvacrol against the housefly, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). *Environmental Science and Pollution Research International*, 26: 23824–23831
- XU HH. 2018. *Plant chemical protection*. Beijing: China Agriculture Press, pp. 83–89 (in Chinese) [徐汉虹. 2018. 植物化学保护学. 北京: 中国农业出版社, pp. 83–89]
- ZHANG JH, MA S, DU SL, CHEN SY, SUN HL. 2019. Antifungal activity of thymol and carvacrol against postharvest pathogens *Botrytis cinerea*. *Journal of Food Science and Technology*, 56(5): 2611–2620
- ZHANG M, GE J, YU XY. 2018. Transcriptome analysis reveals the mechanism of fungicidal of thymol against *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. *Current Microbiology*, 75(4): 410–419
- ZHANG X. 2011. *Overview of biopesticides*. Beijing: China Agriculture Press, pp. 165–202 (in Chinese) [张兴. 2011. 生物农药概览. 北京: 中国农业出版社, pp. 165–210]
- ZHOU D, WANG Z, LI M, XING M, XIAN T, TU K. 2018. Carvacrol and eugenol effectively inhibit *Rhizopus stolonifer* and control postharvest soft rot decay in peaches. *Journal of Applied Microbiology*, 124(1): 166–178