分类号： 密级：

U D C ： 编号：



硕士学位论文

**Carvacrol 对两种重要植物病原真菌抑菌活性及其作用机制的初步研究**

**Preliminary Study on Antifungal Activity and Mechanism of Carvacrol aganist Two Important Plant Pathogenic Fungi**

**硕士研究生 ：张晓丽**

**指 导 教 师：叶敏 研究员申请学位类别：农学硕士**

**专** **业：农药学**

**培 养 学 院：植物保护学院**

**二〇一四年五月**

**独创性声明**

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得云南农业大学或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名： 时间： 年 月 日

**关于学位论文使用授权的声明**

本人完全了解云南农业大学有关保存、使用学位论文的管理办法及规定，即：云南农业大学有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意云南农业大学可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

**(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 研究生签名： | 时间： | 年 | 月 | 日 |
| 导师签名： | 时间： | 年 | 月 | 日 |

目 录

[摘 要 I](#_bookmark0)

[Abstract III](#_bookmark1)

[1 引言 1](#_bookmark2)

[1.1 稻瘟病概述 1](#_bookmark3)

[1.1.1 稻瘟病的发生发展状况及危害 1](#_bookmark4)

[1.1.2 水稻稻瘟病的病原物 1](#_bookmark5)

[1.1.3 稻瘟病菌的侵染循环 2](#_bookmark6)

[1.1.4 水稻稻瘟病的发病症状 2](#_bookmark7)

[1.1.5 稻瘟病的防治 3](#_bookmark8)

[1.2 番茄灰霉病概述 5](#_bookmark9)

[1.2.1 番茄灰霉病的发生发展状况及危害 5](#_bookmark10)

[1.2.2 番茄灰霉病的病原物 5](#_bookmark11)

[1.2.3 灰葡萄孢的侵染循环及发病规律 5](#_bookmark12)

[1.2.4 番茄灰霉病的发病症状 6](#_bookmark13)

[1.2.5 番茄灰霉病的防治 6](#_bookmark14)

[1.3 植物源杀菌剂的研究进展 7](#_bookmark15)

[1.3.1 植物源杀菌剂活性成分研究概况 8](#_bookmark16)

[1.3.2 植物源杀菌剂作用机制研究概况 10](#_bookmark17)

[1.4 Carvacrol 及其研究现状 11](#_bookmark18)

[1.4.1 Carvacrol 的基本性质 11](#_bookmark19)

[1.4.2 Carvacrol 的杀虫杀菌活性 12](#_bookmark20)

[1.4.3 Carvacrol 抑菌机制研究进展 12](#_bookmark21)

[2 材料与方法 14](#_bookmark22)

[2.1 试验材料 14](#_bookmark23)

[2.1.1 供试病原菌 14](#_bookmark24)

[2.1.2 供试药剂 14](#_bookmark25)

[2.1.3 供试培养基 14](#_bookmark26)

[2.1.4 主要仪器设备 14](#_bookmark27)

[2.2 试验方法 15](#_bookmark28)

[2.2.1 Carvacrol 对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌的抑菌活性 15](#_bookmark29)

[2.2.2 Carvacrol 处理稻瘟病菌和番茄灰霉病菌菌丝的形态观察 17](#_bookmark30)

[2.2.3 Carvacrol 处理稻瘟病菌和番茄灰霉病菌的生理生化测定 18](#_bookmark31)

[3 结果与分析 23](#_bookmark32)

[3.1 Carvacrol 对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌的抑菌活性 23](#_bookmark33)

[3.1.1 Carvacrol 对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌菌丝生长的影响 23](#_bookmark34)

[3.1.2 Carvacrol 对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌孢子萌发的影响 24](#_bookmark35)

[3.2 Carvacrol 处理稻瘟病菌和番茄灰霉病菌菌丝的形态观察 26](#_bookmark36)

[3.2.1 光学显微镜观察结果 26](#_bookmark37)

[3.2.2 扫描电镜观察结果 29](#_bookmark38)

[3.2.3 透射电镜观察结果 33](#_bookmark39)

[3.3 Carvacrol 处理稻瘟病菌和番茄灰霉病菌的生理生化测定 36](#_bookmark40)

[3.3.1 Carvacrol 对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌菌丝细胞膜通透性的影响 36](#_bookmark41)

[3.3.2 Carvacrol 对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌可溶性蛋白含量的影响 36](#_bookmark42)

[3.3.3 Carvacrol 对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌几丁质酶活性的影响 37](#_bookmark43)

[3.3.4 Carvacrol 对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌 N-乙酰葡萄糖胺含量的影响 38](#_bookmark44)

[3.3.5 Carvacrol 对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌过氧化氢酶活性的影响 39](#_bookmark45)

[3.3.6 Carvacrol 对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌麦角甾醇含量的影响 40](#_bookmark46)

[4 讨论 41](#_bookmark47)

[4.1 关于 Carvacrol 对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌抑菌活性的思考 41](#_bookmark48)

[4.2 关于 Carvacrol 处理稻瘟病菌和番茄灰霉病菌菌丝形态观察的思考 41](#_bookmark49)

[4.3 关于 Carvacrol 对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌生理生化测定的思考 42](#_bookmark50)

[5 结论 42](#_bookmark51)

[6 创新点 43](#_bookmark52)

[参考文献 44](#_bookmark53)

[致 谢 50](#_bookmark148)

摘 要

稻瘟病和番茄灰霉病都是危害性非常大的真菌性病害，给生产带来巨大损失。目前为止还主要依靠化学防治，但是化学防治会造成环境污染以及使病菌产生抗药性，使防效大大减弱。因此，出于可持续发展以及绿色化学的需要，植物源杀菌剂越来越受到人们的重视，它不仅不会造成环境污染，而且也不易使病菌产生抗药性。

Carvacrol是紫茎泽兰挥发物的主要成分之一。已有报道它是一种广谱的抗真菌剂及抗细菌剂，并且对人体无毒、无过敏。但未见关于Carvacrol对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌的抑制作用及其作用机制的研究报道。本文初步研究了离体条件下Carvacrol抑制稻瘟病菌和番茄灰霉病菌的活性，及其抑菌机制。结果如下：

1. 采用菌丝生长速率法和孢子萌发法测定了Carvacrol对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌抑制作用，结果表明Carvacrol对两种菌表现出较强的抑制作用，通过实验测得抑制中浓度（EC50）分别为36.07 mg•L-1和10.65 mg•L-1. Carvacrol对两种菌孢子萌发的影响呈无规律变化，且与对照相比变化不显著。

2. 光镜和电镜观察表明，Carvacrol处理的稻瘟病菌和番茄灰霉病菌菌丝形态结构异常。对于稻瘟病菌，当Carvacrol浓度≥7.5 mg•L-1时，菌丝表现为扭曲、粗细不均、内含物固缩；当Carvacrol浓度≥30 mg•L-1时，菌丝局部和顶端膨大；当Carvacrol浓度≥60 mg•L-1时，菌丝分支增多、菌丝细胞出现大液泡、菌体细胞壁模糊不清、出现菌丝断裂的现象。对于番茄灰霉病菌，当Carvacrol浓度≥3.125 mg•L-1时，菌丝内含物分布不均、固缩，出现液泡；当Carvacrol浓度≥6.25 mg•L-1时，菌丝粗细不均、菌丝扭曲；当Carvacrol浓度≥12.5 mg•L-1时，菌丝分支增多、菌丝尖端缺陷、局部膨大、菌丝断裂；当Carvacrol浓度=25 mg•L-1时，菌丝断裂、空腔、畸形现象严重，菌丝细胞壁完全模糊不清。

3. 稻瘟病菌和番茄灰霉病菌经Carvacrol处理后，菌丝细胞膜的透性发生变化，造成菌丝体内含物的渗漏，具体表现为培养液的电导率随着处理时间和Carvacrol浓度的增大而增大。用考马斯亮蓝G-250比色法测定菌丝中可溶性蛋白质的含量，经

Carvacrol处理一定时间后，发现两种菌菌丝中可溶性蛋白含量下降。

4. 实验对几丁质酶的活性以及N-乙酰葡萄糖胺的含量进行了测定，发现几丁质酶的

活性和N-乙酰葡萄糖胺的含量随着时间的变化先升高后降低。

5. 实验采用皂化处理样品法提取并用高效液相色谱法测定菌丝体内麦角甾醇的含量。结果表明，随着Carvacrol浓度的升高，麦角甾醇的含量逐渐降低，表明细胞膜结构受到破坏。

6. 实验对过氧化氢酶活性进行测定，发现过氧化氢酶活性下降，解毒能力降低，菌体死亡。

关键词：稻瘟病菌；番茄灰霉病菌；抑菌活性；菌丝形态；抑菌机制

**Preliminary Study on Antifungal Activity and Mechanism of Carvacrol aganist Two Important Plant Pathogenic Fungi** Zhang Xiaoli(Pesticide Science)

Directed by Ye Min

**Abstract**

The rice blast and grey mold disease caused by *Magnaprothe oryzae* and *Botrytis cinerea* are all fungal disease which have great dangers and cause a heavy loss to agricultural production. So far they mainly rely on chemical control, but chemical control can cause environmental pollution and make the fungi resistant which weaken control effect highly. Therefor, for sustainable development and the need of green chemistry, botanical fungicide are getting more and more attention, they not only do not cause

Environmental pollution, but also do not make the fungi resistant.

Carvacrol is one of the main components of Crofton Weed volatiles. It had been reported to be a broad-spectrum antifungal agent and antibacteria agent, and non-toxic、

Non-allergenic. However, there are no report on the effect of carvacrol on *Magnaprothe oryzae* and *Botrytis cinerea* and its mechanism of action. In this paper, antifungal activity of carvacrol against *Magnaprothe oryzae* and *Botrytis cinerea* and its mechanism of action

Were studies *in vitro*. The results were described as the follwing：

（1）Antifungal activity of carvacrol was determined by mycelial growth rate and spore germination method, it was found that carvacrol had a strong inhibitory effect on *Magnaprothe oryzae* and *Botrytis cinerea* and its inhibitory medium concentration(EC50) were 36.07mg/L and 10.65mg/L directly by experiment determination. By the treatment

With the carvacrol, the spore germination of *Magnaprothe oryzae* and *Botrytis cinerea*

Showed no regularity and prominence comparing with CK.

（2）Light and SEM, TEM observation showed that by the treatment with the

Carvacrol, the mycelial morphology of *Magnaprothe oryzae* and *Botrytis cinerea* showed abnormality. For *Magnaprothe oryzae*, when carvacrol concentration is equal or greater than 7.5mg/L, the mycelium showed twist、uneven thickness、cytoplasm pyknosis; when

Carvacrol concentration is equal or greater than 30mg/L, mycelium top and local inflation; when carvacrol concentration is equal or greater than 60mg/L, increased formation of

Branches、hyphal vacuoles、unclear cell walls and broken mycelium were observed. For

Botrytis cinerea, when carvacrol concentration is equal or greater than 3.125mg/L, the mycelium showed cytoplasm pyknosis and appeared vacuoles; when carvacrol concentration is equal or greater than 6.25mg/L, the mycelium showed twist and uneven thickness; when carvacrol concentration is equal or greater than 12.5mg/L, increased

Formation of branches、tip defects、local inflation、broken mycelium were observed; when

Carvacrol concentration is equal 25mg/L, mycelium breakage、cavity and deformity were serious, cell walls were unclear completely.

（3）After adding carvacrol, the penetrability of cell membrane changed, resulting in leakage of inclusion of mycelium, for specific performance the conductivity of the culture medium showed a increasing trend as the increases of concentration and time. The content of soluble protein in mycelium was determined with Coomassie Brilliant Blue G-250 colorimetric method. By treatment with carvacrol, the content of soluble protein was

declined.

（4）We found that the chitinase activity and the N-acetyl glucosamine content increased first and then decreased with the prolonging of treatment time after adding carvacrol by experiments on chitinase activity and N-acetyl glucosamine content assay.

（5）Ergosterol was extracted by the saponification method, then measured by HPLC,

The results showed that with the increase of the concentration, the content of ergosterol decreased showing that the membrane structure was damaged.

（6）Through experiments about the catalase activity assay, the catalase activity

Decreased resulting in reduction of detoxification. The cell of fungi were death.

**Key Words**: *Magnaprothe oryzae*; *Botrytis cinerea*; Antifungal activity; Mycelial morphology; Antifungal mechanism

## **1** 引言

### **1.1** 稻瘟病概述

#### **1.1.1** 稻瘟病的发生发展状况及危害

有关稻瘟病的记载可以追溯到很早的时期，宋应星在1637年所著《天工开物》

一书中最早描述了稻瘟病发生的现象。稻瘟病菌1881年由加瓦纳在意大利命名，白

井1896年在日本予以描述[[1]](#_bookmark54)。

稻瘟病（Blast Fungus），目前是世界性分布、危害最重的病害之一，英联邦真菌研究所（CMI）记载了全世界70个国家报道过发生该病害，尤其在东南亚、日本、韩国、印度和我国发生特别严重。可以说实际上任何大面积栽培水稻的地区都有该病害。该病又称稻热病，俗称火烧瘟、吊头瘟、掐颈瘟等[[2](#_bookmark55)]，与纹枯病、白叶枯病被列为我国水稻三大病害。病害流行地区，一般减产10%-20%，重的可达40%-50%，特别重的田块甚至颗粒无收[[3]](#_bookmark56)。90年代以来，我国稻瘟病的年发生面积均在380万hm2以上，年损失稻谷达数亿公斤，例如浙江省1980年晚稻稻瘟病流行，损失稻谷达2.5

亿公斤，福建省1981年早稻稻瘟病大流行，稻谷减产1.5亿公斤，安徽省1993年因

受其危害，损失稻谷约2.0亿公斤[[4]](#_bookmark57)。

#### **1.1.2** 水稻稻瘟病的病原物

病原物无形态为稻梨孢*pyricularia oryzae* Cav. 属半知菌亚门梨孢霉属。异名有*piricularia oryzae* Cav., *pyricularia grisea*(Cke) Sacc.. 其有性态为灰色大角间座壳*Magnaporthe grisea*(Hebert) Barrnov.，属于子囊菌亚门大角间座壳属，但一般不常见。

菌丝具有分隔和分枝，初期无色，后变褐色。分生孢子梗3-5根成束获单生，从病部气孔或表皮伸出，大小112-456μm×3-4μm，不分枝，有2-8个隔膜，基部淡褐色，上端色淡，顶端呈曲状，有分生孢子产生。分生孢子梨形，大小17-33μm×6.5-11.0μm，初无隔膜，成熟时通常有2个隔膜，顶细胞立锥状，基部细胞钝圆，有脚胞。孢子萌发时，可从两端细胞产生芽管，顶端形成膜厚而褐色的附着胞。附着胞近圆形，长出侵染丝，侵入寄主组织[[5]](#_bookmark58)。

稻瘟病在高湿适温，露、雾、雨存在的条件下容易发病。稻瘟病菌丝体发育温度8-37℃，适温26-28℃。分生孢子形成温度10-35℃，适温25-28℃。孢子萌发温度与孢子形成温度相同，孢子萌发要求相对湿度在90%以上，且有水滴存在时，持续6-8

小时孢子才能良好萌发。附着胞形成适温24℃，28℃以上不能形成。

稻瘟病菌在自然条件下，一般只侵染水稻，除此外，还可侵染小麦、大麦、玉米、狗尾草、稗、早熟禾等23属38种植物。

#### **1.1.3** 稻瘟病菌的侵染循环

病原菌以菌丝和分生孢子在病稻草、病谷上越冬。病稻草和病谷是翌年病害的主要初侵染来源，当第二年气温回升到20℃左右时，遇降水不断产生分生孢子。孢子借风雨传播，遇适宜温、湿度萌发并直接侵入表皮上的机动细胞，其尖端释放的粘胶及芽孢使孢子紧密地附着在寄主上，接着分生孢子便利用自身孢子的内源营养而萌发形成发芽管，发芽管又特异性分化产生附着胞，附着胞产生侵染栓穿透寄住组织的角质层和表皮细胞壁，继而在寄主细胞中生长，侵染邻近表皮细胞并深入叶肉细胞，稻瘟病菌侵染水稻5-7天后出现症状，完成侵染后，被侵染的细胞又产生新的菌丝和分生孢子梗，分生孢子梗又分化出分生孢子并从病斑中释放出来，依靠气流再次传播，形成重复侵染[[6]](#_bookmark59)。

#### **1.1.4** 水稻稻瘟病的发病症状

稻瘟病在整个水稻生育期都有发生，根据受害时期和部位不同，可分为苗瘟、叶瘟、叶枕瘟、节瘟、穗瘟、穗颈瘟、枝梗瘟和谷粒瘟[[5]](#_bookmark58)。

苗瘟：发生在3叶期以前，由种子带菌所致。初期在芽和芽鞘上出现水渍状斑点，随后病苗基部变黑褐色，上部呈黄褐色或淡红色，严重时病苗枯死。潮湿时，病部可长出绿色霉层。

叶瘟：发生在3叶期以后。随水稻品种抗病性和天气条件的不同，病斑分为白点

型、急性型、慢性型和褐点型等4种症状类型。①白点型。为初期病斑，白色，多为圆形，不产生分生孢子。在感病品种的幼嫩叶片上发生时，遇适宜温、湿度能迅速转变为急性型病斑。②急性型。病斑暗绿色，多数近圆形，针头至绿豆大小，后逐渐发展为纺锤形。正、反两面密生灰绿色霉层。在温、湿度适宜及存在大量感病品种的条件下，很易引起病害流行。③慢性型。遇干燥天气或经药剂防治后，急性型病斑使转化为慢性型。典型的慢性型病斑呈纺锤型，最外层黄色，内圈褐色，中央灰白色；病斑两端有向外延伸的褐色坏死线。病斑背面也产生灰绿色霉层。慢性型病斑自外向内可分为中毒部、坏死部和崩溃部。④褐点型。病斑为褐色小点，多局限于叶脉间，中央为褐色坏死部，外围为黄色中毒部，无分生抱子，常发生在抗病品种或稻株下部老

叶上。

叶枕瘟：叶耳易感病。初为污绿色病斑，向叶环、叶舌、叶鞘及叶片不规则扩展，最后病斑灰白色至灰褐色。潮湿时长出灰绿色霉层，病叶早期枯死，容易引起穗颈痕。

节瘟：主要发生在穗颈下第一、二节上，初为褐色或黑褐色小点，以后环状扩大至整个节部。潮湿时，节上生出灰绿色霉，易折断。常因水分和养料的输送受阻，影响谷粒饱满；发生早而重时，亦可造成白穗。

穗颈瘟和枝梗瘟：发生于穗颈、穗轴和枝梗上。病斑初呈浅褐色小点，逐渐围绕穗颈、穗轴和枝梗及向上下扩展，病部因品种不同呈黄白色、褐色或黑色。穗颈发病早的多形成全白穗，发病迟的则谷粒不充实，其危害轻重与感病迟早密切相关。

谷粒瘟：发生在谷壳和护颖上。发病早的病斑大而呈椭圆形，中部灰白色，以后可延及整个谷粒，造成暗灰色或灰白色的瘪谷。发病迟的则为椭圆形或不规则形的褐色斑点。严重时，谷粒不饱满，米粒变黑。

#### **1.1.5** 稻瘟病的防治

##### **1.1.5.1** 选育和推广抗病品种

选育和推广抗病品种是稻瘟病防治最经济有效的方法。20世纪90年代，评价出的22个抗病品种，如汕优94-4、K优404等，大部分已开始在生产上大面积推广应用或试种[[7]](#_bookmark60)。但由于稻瘟病菌生理小种的复杂性和高度变异，一个抗病品种往往在推广若干年后，就因为产生能侵染该品种的优势小种而丧失抗性，特别是含有单个主效抗病基因的品种更是如此[[8]](#_bookmark61)。

##### **1.1.5.2** 农业防治

农业上防治稻瘟病的方法如下：①稻瘟病菌以菌丝和分生孢子附着在病稻草和病谷上越冬，是第二年病害侵染和主要病原，切断病原是稻瘟病防治有效、无害的主要途径[[9]](#_bookmark62)。②避免在同一个地方长期种植同一品种，实行品种轮换或水稻多抗性品种混合栽种[[10]](#_bookmark63)。③水稻的保健栽培。可以采用两段育秧、旱地育秧、宽窄行栽培、培育壮苗等措施，培育健壮的秧苗。合理排灌，合理施肥，不偏施和过多施用氮肥[[11]](#_bookmark64)。

##### **1.1.5.3** 化学防治

根据多年的经验，在病好流行或品种抗病性丧失期间，最主要、有效的防治措施是化学防治。化学防治的优点是经济、方便、高效、迅速，它一直都是在综合治理稻瘟病中不可缺少的部分。早期防治稻瘟病的主要杀菌剂是以铜制剂为代表，主要是以

硫酸铜为原料的波尔多液，它们对稻瘟病的防治效果一般且容易产生药害。1915年有机汞化合物首次被用于种子处理，上世界50年代出现过有机汞类农药，它们对稻

瘟病有一定的防效且药害小于铜制剂。但由于对人的毒性问题，日本于1968年立法禁止其在农业生产上的应用，其他国家随后也陆续禁止了有机汞类化合物的使用。20世纪60至80年代，有机氯及有机磷类农药迅猛发展，新的稻瘟病抑制剂，如稻瘟净、异稻瘟净、四氯苯肽、稻可宁、稻瘟醇和克瘟散等开始被广泛使用，但这些农药一般在环境中残留量大且不容易降解，容易对后茬作物产生药害，并存在对人畜安全的潜在风险，因此，大部分品种都被逐渐禁用或淘汰。20世纪90年代至目前，主要以黑色素合成抑制剂三环唑防治稻瘟病[[12]](#_bookmark65)，它既可以用于水稻浸根，也可以用于叶面喷施，对稻瘟病有着很好的防治效果，市面上主要有20%和75%可湿性粉剂两个品种[[13]](#_bookmark66)。

虽然化学农药在稻瘟病发病季节防治及时且有效，但是农药的广泛使用会对害虫及其天敌、水生生物及土壤造成危害，同时也对人类构成危害及对水源造成污染。再者长期大量的使用农药会使病原菌产生抗药及耐药性[[14]](#_bookmark67)，降低农药的防治效果。随着科学的发展和人类生活水平的提高，人类的环保意识逐渐增强，开始重视到传统化学农药的各种弊端。

##### **1.1.5.4** 生物防治

植物源农药最能体现生物防治的特点，它不仅不会造成环境污染，不易使病菌产生抗药性，为人们提供更安全更高效的生防途径，而且植物源农药还具有种植广泛，取材容易，成本较低等特点，近年来日益受到人们的重视。

Amadioha A C[[15]](#_bookmark68)发现，印度楝树( *Azadirachta indica*, neem)种子的油浸提物、乙醇浸提物和冷水浸提物对稻瘟病在温室的防效较好，与0.1% a. i.多菌灵的防效等同。Rajappan K也报道，印楝和pungam oil对稻瘟菌的菌丝生长有抑制[[16]](#_bookmark69)。骆焱平等[[17]](#_bookmark70)发现南药植物丙酮提取物对稻瘟病菌丝生长有抑制效果。张应烙等[[18]](#_bookmark71)发现孜然种子丙酮提取物质量浓度为0.1 g/mL对稻瘟病菌孢子萌发抑制率大于90%，质量浓度为0.04 g/mL对稻瘟病治疗作用达89.5%以上。霍光华等[[19]](#_bookmark72)研究表明，木荷叶和无患子中果皮的皂苷抽提物以3: 4到15:8的质量配比时产生了显著的增效抗稻瘟作用，并在其他配比时有相加作用。Lee Sung-Eun等的研究结果表明[[20]](#_bookmark73)，Piper longum果的乙烷抽提物对稻瘟菌的抑制率为33 %。胡新文等报道，萝卜种子抗真菌蛋白Rs-AFPs对稻瘟菌表现出很强的抑菌活性[[21]](#_bookmark74)。

### **1.2** 番茄灰霉病概述

#### **1.2.1** 番茄灰霉病的发生发展状况及危害

番茄（*Lycopersicon Esculentum*）原产于美洲，现在广泛栽培于世界各地，是人类日常生活中不可缺少的主要蔬菜之一，其产量高，营养丰富，富含维生素类和糖类，既可生食又可做加工之用，因而深受人们喜爱[[22]](#_bookmark75)。作为番茄出口大国的中国，番茄种植面积约145.5万hm2，而保护地栽培面积已达21.7万hm2，年产量约837.8万t，且以每年6％-8％的速度增长[[23]](#_bookmark76)，但是伴随着番茄上的各种病害也在逐年增加。其中番茄灰霉病已成为近10年保护地危害最大的病害，一般年份可减产10%～20%，严重时可达50%以上，成为灾害性病害[[24]](#_bookmark77)。

#### **1.2.2** 番茄灰霉病的病原物

病原为灰葡萄孢*Botrytis cinerea* Pers.，属半知菌亚门葡萄孢属。孢子梗数根丛生，具隔，褐色，顶端呈1-2次分枝，分枝顶端稍膨大，呈棒头状，其上密生小柄并着生大量分生孢子，孢子梗长短与着生部位有关。分生孢子圆形至椭圆形，单胞，近无色，大小6.25-13.75μm×6.25-10.0μm，寄主上通常少见菌核，但当田问条件恶化后，则可产生黑色片状菌核。从番茄果实及叶上分离的灰霉菌，在普通培养基上生长一周后，开始产生菌核。两周后菌核大小为3.0-4.5μm×1.8-3.0 mm。培养基上菌丝无色透明，有隔膜[[5]](#_bookmark58)。

#### **1.2.3** 灰葡萄孢的侵染循环及发病规律

病菌主要以菌核在土壤中或以菌丝块及分生孢子随病残体在土壤中越冬。翌春条件适宜，菌核萌发，产生菌丝体和分生孢子。分生孢子成熟后脱落，借气流、雨水或露珠及农事操作进行传播。分生孢子萌发长出芽管，从寄主伤口或衰老的器官及枯死的组织上侵入。沾花是重要的人为传播途径。花期是侵染高峰期，尤其在穗果膨大期浇水后，病果剧增，是烂果高峰期，以后在病部又可产生大量分生孢子，借气流传播进行再侵染。该病菌为弱寄生菌，可在有机质上腐生。低温高湿是影响灰霉病发生的主要因素，灰霉病菌的菌丝在2℃～31℃之间均能生长，20℃～25℃最为适宜，10℃以下和30℃以上生长明显减弱。日光灯和黑暗各12 h交替，菌丝生长最好。最适pH为5。病菌孢子萌发的条件和菌丝略有不同，最适温度为24℃～25℃，55℃～

56℃10min可使孢子致死，水滴中萌发率最高，最适pH 6.24～6.41，在日光灯12 h

条件下生长也最好[[25,](#_bookmark78) [26]](#_bookmark79)。一般12月至翌年5月，如遇连续阴雨天气，不能及时放风，

特别是加温温室刚停火时，棚室内气温低，相对湿度持续90％以上，气温20℃左右，病害发生严重。密度过大，管理不当，通风不良，都会加快此病的扩展。

#### **1.2.4** 番茄灰霉病的发病症状

主要危害花、果实、叶片及茎。果实发病，青果受害重，造成大量烂果。病菌多先从残留的柱头或花瓣侵染，后向果面或果柄扩展，呈灰白色腐烂，病部长出大量灰绿色霉层，果实失水后僵化。叶片发病，多从叶缘呈“V”字形向内扩展，初水浸状，浅褐色，边缘不规则，具深浅相间轮纹，后病部产生灰霉，致叶片枯死。茎部发病，开始亦呈水浸状小点，后扩展为长椭圆形或长条形斑，湿度大时病斑上长出灰褐色霉层，严重时引起病部以上枯死[[5]](#_bookmark58)。

#### **1.2.5** 番茄灰霉病的防治

##### **1.2.5.1** 培育抗病品种

目前国内外的育种家们对灰霉病菌的发病机理展开了大量的研究[[23,](#_bookmark76) [27,](#_bookmark80) [28]](#_bookmark81)，希望找到灰霉病发病的主效基因，从而为通过抗病育种技术培育抗灰霉病的番茄新品种奠定基础。然而，截至目前，番茄灰霉病菌的抗源仍未找到[[29]](#_bookmark82)。原因在于灰霉病菌是弱寄生菌，只有在外界条件适合时才可以诱发番茄发病，因此很难通过常规的分子生物学手段寻找到抗灰霉病的主效基因。

##### **1.2.5.2** 农业防治

栽培管理也是预防灰霉病的重要措施。播种前，应对苗床和种子消毒；播种后多通风换气，进行变温管理，培育壮苗。保护地要注意调控温湿度，避免阴雨天浇水，防止大水漫灌，推广滴灌、膜下暗灌技术，降低保护地内湿度，抑制灰霉病发生和再侵染；尤其是日均温在低于15℃情况下，采取加温措施可有效预防灰霉病的发生，促进番茄生长；要合理轮作、倒茬、深耕，施足腐熟的有机肥，增施磷钾肥，提高植株抗病能力。另外，还要及时清除田间的老叶、病叶、病果及病株等，增强田间通风透光能力。另外在幼果期或蘸花后7 d～15 d及时摘除残留花瓣及柱头，减少初侵染点也是1种直接简便的防治方法[[30]](#_bookmark83)。

##### **1.2.5.3** 化学防治

目前，对于灰霉病主要以化学防治手段为主。我国使用的防治灰霉病的药剂主要有苯并咪唑类（如多菌灵）、二甲酰亚胺类（如速克灵）和氨基甲酸酯类（乙霉威）等杀菌剂。但灰霉病菌产孢量大，繁殖速度快，发病周期短，极易对单一药剂产生

抗药性[[31]](#_bookmark84)，而且随着人们生活质量的提高，对环境保护及绿色食品也日益重视，化学药剂带来的农药残留、环境污染以及破坏生态系统中生物多样性和相互平衡关系等一系列问题，使人们开始将农药开发重点转向对环境友好型药剂。

##### **1.2.5.4** 生物防治

植物源农药最能体现生物防治的特点，它不仅不会造成环境污染，不易使病菌产生抗药性，为人们提供更安全更高效的生防途径，而且植物源农药还具有种植广泛，取材容易，成本较低等特点，近年来日益受到人们的重视[[32]](#_bookmark85)。

研究证明，苦豆子、石榴、大花金挖耳、苍耳、孜然等10余种植物的提取液对灰霉菌株菌丝生长、孢子萌发具有明显的抑制作用[[33-35]](#_bookmark86). Romanazzi Gianfranco [[36]](#_bookmark87)使用壳聚糖和乙醇进行灰霉菌抑制试验，结果表明二者均有抑菌作用，但是与壳聚糖、乙醇单独作用相比，较小剂量的壳聚糖和乙醇混合使用可明显提高对灰霉菌的抑制作用。王树桐等[[37]](#_bookmark88)报道室内测得丁香的甲醇提取物在1000μg/mL时对番茄灰霉病菌菌丝生长抑制率在80％以上，此浓度下能完全抑制分生孢子的萌发。王兴全，张新虎[[38]](#_bookmark89)使用苍耳提取物研究其对番茄灰霉病菌的抑制作用和机理，结果显示出苍耳提取物对分生抱子的形成和萌发、菌丝生长有较强的抑制作用。当苍耳提取物浓度为30

mg/mL时，其对分生孢子形成、萌发的抑制率分别为85.3%、77.8%，对菌丝生长的抑制率达到78.5%。耿建峰[[39]](#_bookmark90)研究了大蒜提取物和洋葱油对灰霉菌病原菌的孢子萌发和菌丝生长的抑制作用及其对草莓灰霉病防治作用。王桂清[[40]](#_bookmark91)的实验采用了辽细辛提取物，采用孢子萌发法和生长速率法测定了辽细辛根的不同溶剂粗提取物对灰霉菌孢子萌发和菌丝生长的抑制效果。结果显示，不同溶剂提取物对孢子萌发和菌丝生长均产生一定的抑制作用。

### **1.3** 植物源杀菌剂的研究进展

1977年Swain认为植物是生物活性化合物的天然宝库，其产生的次生代谢产物超过400000种，其中的大多数化学物质如萜烯类、生物碱、类黄酮、甾体、酚类、独特的氨基酸和多糖等均具有杀虫或抗菌活性[[41]](#_bookmark92)。Wilkings和Board于1989年撰文报道有1389种植物有可能作为杀菌剂，其中包含了许多不同类型的化合物[[42]](#_bookmark93)。其不仅不会造成环境污染，不易使病菌产生抗药性，为人们提供更安全更高效的生防途径，还具有种植广泛，取材容易，成本较低等特点，因此近年来日益受到人们的重视，其研制与开发具有广阔前景。

目前人们对具有抑菌、杀菌活性的植物种类已经研究得比较清楚，其中大部分资源集中在十字花科、菊科、豆科、唇形科、茄科等植物中。此外，陈娇等发现：虎耳草、黄檀、马尾松、牡丹和刺槐的提取物对葡萄霜霉病有抑菌效果[[43]](#_bookmark94)。李玉平研究发现蓼子朴、天明精、大花金挖耳等16种植物对番茄灰霉病菌的抑制侵染率达到60％以上，大花金挖耳、旋覆花和猪毛蒿3种植物对苹果炭疽病菌具有60％以上的抑菌作用[[44]](#_bookmark95)。赵纯森等从厚扑树的自然落叶中提取总酚化合物对供试10种真菌都有很强的抑制作用，水提取物在2000mg/kg盆栽条件下能杀死土壤中棉立枯病菌；田间对小麦白粉病、蚕豆赤斑病高峰期喷提取物一次可明显控制病情发展[[45]](#_bookmark96)。Maruzzellahe

Baalter系统研究了119种植物精油对12种真菌的作用，发现84％的精油至少能抑制其中两种真菌的生长，表明植物精油具有广谱的抑菌活性，有可能作为植物杀菌剂[[46]](#_bookmark97)。

#### **1.3.1** 植物源杀菌剂活性成分研究概况

随着化学和其它学科的迅速发展，植物体内的抗菌物质及其抗菌作用研究更为广泛，许多具有抗菌活性的物质从植物体内分离出来，这些具有抗菌活性的植物有效成分类型较多，主要有以下几类：

萜类（如倍半萜类、皂苷类等）：植物体内萜类化合物的分离、抗菌作用研究比较多。Cole[[47]](#_bookmark98)等从Scutellaria属植物中分离获得两种新的双萜类化合物，不仅能抑制尖孢镰孢霉等病原菌的菌丝生长，同时抑制其分生孢子萌发。陈征宇[48]等从非洲药用植物*Clerdenrum uncinatum*中分离得到一种新的抗真菌的萜类化合物氢化喹啉酮二萜，对爪枝孢属具有强烈的抑制活性。郁建平等[[49]](#_bookmark99)运用GC-MS技术分析了金丝桃挥发油成分中的萜类物质，并对其进行了抑菌试验，结果表明该物质对白色菌株、绿脓杆菌和大肠杆菌具有明显的抑制作用。Harborne等（1989）从受伤的紫玫瑰（*Rosa rugosa*）叶中分离到的倍半萜类抗真菌成分，低浓度下，能阻碍扁豆枝孢属

（*Cladosporium herdarum*）生长[[50]](#_bookmark100)。

含氮含硫化合物：主要有生物碱、胺及酰胺类化合物。Grayer R. J.等（1983）发现异喹啉小檗碱能防止*Mahonia trifoliata*和*M. Swaseyi*两种真菌引起的根腐烂[[51]](#_bookmark101)。

WIPPICH等（1985）指出芦竹碱（gramine）和喹嗪生物碱（Sparteine, lupanine）和13-tegloyloxylupanine对大麦白粉病菌（Erysiphe graminis）的生长有害，只需1～5 mmol/ L就能阻止大麦白粉病菌分生孢子萌发[[52]](#_bookmark102)。MUIRHEAD等（1984）在香蕉（*Musa*

spp.）皮中发现含量很高的胺类化合物dopamine，这种含氮化合物对香蕉炭疽菌

（*Calletotrichum musae*）具有抗菌活性[[51,](#_bookmark101) [53]](#_bookmark103)。Harborne等（1993）发现许多植物中普遍含有多种胺类化合物如Spermidine 和Spermine，这两种化合物能抑制青霉素

（*Penicillium spp*）分生孢子的萌发[48, [50]](#_bookmark100)。酰胺类化合物如Sinharine是Greger等（1992,

1993）在ft小桔属（*Glycosmis*）的两种植物中发现的含硫化合物，其对枝状孢霉

（*Cladosporium cladosporioides*）具有抗菌活性[48, [51]](#_bookmark101)。

脂肪类化合物：脂肪类化合物主要是长链碳烷和脂肪酸。Cupta等（1988）从莪术（*Curcuma zediaria*）的干燥根茎研究中发现羧酸类广谱抗真菌成分，其结构为反式-对-甲氧基桂皮酸乙酯，在小于10μg/mL的浓度下就能抑制红须发癣菌（*Trichophyto*

*rudrum*）、黑曲霉（*Asperigillus niger*）、酿酒酵母菌（*Saccharomyces cerevisiae*）和絮状表皮癣菌（*Epidermophyton flaccosum*）的生长，在小于25μg/mL的浓度下能抑制烟曲霉（*Asperigillus fumigatus*）、产紫青霉（*Penicillium purp urogenum*）、三角酵母

（*Trigonopsis variavilis*）、白地霉（*Geotrichum candidae*）、尖孢镰孢霉和稻长蠕孢霉

（*Helminthosporium oryzae*）。在小于50μg/mL 时还能抑制克鲁假丝酵母（*Candid akrusei*）和须发癣菌等菌的繁殖生长[48, [51]](#_bookmark101)。Mcdowell 等（1988）从植物没药

（*Commiphorarostrata*）的茎皮中分离出3种简单的链烷化合物2-decanone、2-undecanone和dodecanone，抗菌实验表明这三种化合物对曲霉属（*Asperigillus*）和青霉属（Penicillium）的许多种具有抗菌活性（MIC: 5.0×10 -3μg/mL）[[51]](#_bookmark101)。

芳香族化合物：许多芳香族化合物具有抗菌活性。酚类化合物是很好的抗菌物质。

ITO等在樱桃树（*Prunu syedoensis*）叶中提取到苯甲醇化合物，发现该化合物对草本枝孢霉（*Cladosporium herdarum*）的生长具抑制作用[[51]](#_bookmark101)。黄酮类化合物，特别是异黄酮化合物具有很强的抗菌作用，越来越多的黄酮类化合物从植物中分离出来。

Bbarenar等从光亮蜡菌（*Helicbrysumnitens*）的外角层中提取出6种甲基化黄酮类化合物，其中1μg的二甲氧基黄素（Chrysindimehtylehter）和三甲氧基galnagin，2μg的5, 6,7,8-四甲氧基黄酮以及5μg的三甲氧基黄酮均对铺在平板上的瓜枝孢霉生长有抑制作用[[54]](#_bookmark104)。芪类化合物是另一类芳香族化合物。Cooksey等（1988）从落花生（*Ar aechis hypiogaea*）中提取到了一种二苯芪化合物3-异戊二烯基-4, 3′，5′-三烯羟基芪类在14μg/mL的浓度下就可抑制黄曲霉的繁殖，而在11.3μg/mL下可抑制菌丝生长[[55]](#_bookmark105)。

Adesanya等（1989）从黄独（*Dioscorea bulbifora*）和灌木黄独（*D. dumetorum*）中提取到抗真菌成分3, 5, 4′-三羟基二苯，其对枝状孢霉（MIC: 50μg/mL）、须发癣菌

（M IC: 1000mg/mL）都具有抑菌活性[[56]](#_bookmark106)。

蛋白质类：HUANG Zheng-yu等（1997）从玉米（*Zeamays* L.）中分离出大小为28kDa 和100kDa 两种蛋白质，可以抑制黄曲霉的生长，抑菌浓度为26 μg/mL 和

75μg/mL[[57]](#_bookmark107)。周立等（1998）用小麦品种SW89-2589的多聚半乳糖醛酸酶作用四种病原真菌，发现小麦PGIP对四种病原真菌生长有抑制作用[[58]](#_bookmark108)。

#### **1.3.2** 植物源杀菌剂作用机制研究概况

目前，发现抑菌植物并从中分离鉴定抑菌活性成分的研究已有不少报道，关于其抑菌机制的报道也越来越多。该方面的研究多采用植物提取物对病原菌的直接作用，如抑制菌丝生长、抑制游动孢子的产生、附着胞形成及侵入丝形成等对寄住的作用；诱导寄住产生抗性、增强寄住的生长及繁殖能力、保鲜及贮藏能力等。

##### **1.3.2.1** 作用于植物病原菌细胞壁

细胞壁的主要作用是保护微生物免受周围环境的机械损伤和渗透压改变的影响。沈寿国、石志琦等发现蛇床子素处理造成小麦赤霉病菌菌丝断裂，初步研究推论

蛇床子素能抑制小麦赤霉病菌对葡萄糖的吸收，导致糖饥饿，引起几丁质酶活性升高，进而影响小麦赤霉病菌菌丝细胞壁的形成[[59,](#_bookmark109) [60]](#_bookmark110)。

##### **1.3.2.2** 作用于菌体细胞膜

细胞膜是一种半透性膜，其主要成份是脂类和蛋白质，丝状真菌的细胞膜还含有麦角出醇。细胞膜是细胞的选择性屏障，能够控制细胞内外物质的交流。细胞膜上存在着一些酶，因而，可进行一些生理代谢活动。有些植物源杀菌剂作用于菌体细胞膜，从而破坏其选择性屏障功能。Nguefack J等[[61]](#_bookmark111)通过流式细胞分析技术研究了3种植物精油对无害利斯特菌的抑制作用机理是精油可增加细胞膜的渗透性；植物浸提物多烯类化合物作用于真菌细胞膜，与植物中麦角甾醇作用，损伤细胞质膜，造成细胞内原生质渗漏，细胞破裂死亡，从而起到杀菌作用；香叶醇可提高细胞外渗透并增加真菌细胞的流动性、降低细胞膜脂质层的相变温及膜脂的流动性。

##### **1.3.2.3** 作用于蛋白质合成系统和能量代谢系统

合成蛋白质是细胞生长最基本的活动。蛋白质合成受到抑制，势必抑制微生物的生长。张新虎等[[33]](#_bookmark86)等研究发现，经苍耳提取物处理后，番茄灰霉病菌菌丝体的可溶性蛋白含量下降。处理后4h，可溶性蛋白质的含量为39.08 mg/mL，比对照（48.06 mg/mL）低18.7%；之后下降幅度较缓慢，处理后8 h，可溶性蛋白质的含量比对照

下降13.9 %；处理后64 h，比对照降低33.4 %。

Khambay B P S [[62]](#_bookmark112)等研究体外BTG505和董尼酮对细胞色素氧化酶、NADH、氧化磷酸化的作用，前者是抑制线粒体细胞色素C氧化酶，后者是抑制线粒体氧化磷酸化，但既存的另一种萘醌类杀菌剂二噻农作用于呼吸链的多靶点。

##### **1.3.2.4** 与菌体内结构结合，扰乱正常代谢

植物中某些活性成分含有OH基团，而OH基团很活泼，容易与酶中活性部位形成氢键，进而导致代谢系统紊乱。如大蒜素的作用机理是分子上硫代磺酸基团与菌体中含巯基的物质反应，抑制了菌体正常代谢所需的重要物质[[63]](#_bookmark113)。茶多酚在抑菌过程中，其酚羟基可与蛋白质分子中的氨基或羧基结合，其疏水性的苯环结构也可与蛋白质发生疏水结合，茶多酚与蛋白质之间的这种多点结合作用阻止了细菌的侵染，使其具有抑菌性[[64]](#_bookmark114)。

##### **1.3.2.5** 通过提高植物抗（耐）病力而防病治病

有些植物提取物不但作用于病原真菌还对寄住植物的防御系统起活化作用。Karavaev V A等[[65]](#_bookmark115)研究发现欧洲防风草和紫草叶子提取物强烈抑制禾白粉菌无形孢子和禾柄锈菌夏孢子的萌发，试验表明植物提取液激发了小麦自身的合成系统，从而使得光和系统II释放O2；刘学瑞等[[66]](#_bookmark116)对天然植物性农药MHII-4的作用机理进行了研究，结果表面：MHII-4对TMV和CMV有强烈的体外钝化作用，并能明显抑制病毒在烟草植株体内的增殖，同时该药剂能显著提高烟草植株体内过氧化物酶的活性。

### **1.4** **Carvacrol**及其研究现状

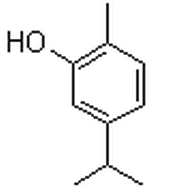
#### **1.4.1** **Carvacrol**的基本性质

Carvacrol化学名为5-异丙基-2-甲基苯酚，是一种单萜酚，又称香荆芥酚、异麝香草酚、异丙基甲苯酚等，其为无色至浅黄色液体，溶于乙醇、乙醚等，不溶于水，其结构式如图1-1。它普遍存在于各种天然植物挥发油中，是牛至油、ft地椒油、百里香油等的主要成份。早在20世纪初国外就将其作为一种香料开始在食品中使用，至今仍作为香料用于口腔用品、牙膏、爽身粉、香皂等日用品[[67-69]](#_bookmark117)。过去的研究表明，

CV是一种广谱的抗真菌剂及抗细菌剂，且具有抗氧化及驱虫等作用，被用于饲料添加剂、抗氧剂、卫生杀菌剂、驱虫剂、防腐剂等[[67-69]](#_bookmark117)，又因其具有百里香的香味，对人体无毒、无过敏，用于食品添加剂、脱味剂等[[67-69]](#_bookmark117)。近年来的研究发现，CV对黑色素瘤[[70]](#_bookmark118)、肺癌[[71]](#_bookmark119)、平滑肌肉瘤[[72]](#_bookmark120)、白血病[[73]](#_bookmark121)、乳腺癌[[74]](#_bookmark122)等多种肿瘤细胞的具有抑

制增殖及诱导凋亡作用。

**图1-1** **Carvacrol（5-异丙基-2-甲基苯酚）**



#### **1.4.2** **Carvacrol**的杀虫杀菌活性

张静等[[75]](#_bookmark123)采用玻片浸渍法测定了11种酚类物质对朱砂叶螨的毒杀作用，结果表明，在1g/L的供试浓度下，Carvacrol对朱砂叶螨具有很好的触杀作用，48 h的校正死亡率就达100%，可显著影响卵的正常孵化，并且对朱砂叶螨的产卵抑制率在80%以上。王玲等[[76]](#_bookmark124)研究发现Carvacrol对粘虫有较好的毒杀活性，处理24h后的致死浓度（*LC50*）为12.7mg/L。王新伟等[[77]](#_bookmark125)采用制片扩散法和稀释法研究发现Carvacrol对大肠杆菌（*Escherichia coli*）和金黄色葡萄球菌（*Staphalococcus aureus*）均有明显的抑制作用，随着添加量的增加，抑菌能力增强。

#### **1.4.3** **Carvacrol**抑菌机制研究进展

王晓君等[[78]](#_bookmark126)研究发现在Carvacrol 的胁迫下，金黄色葡萄球菌（*Staphalococcus*

*aureus*）着色变深，菌体变大，多呈双球状、短链状或单个散在；枯草芽孢杆菌（*Bacillus*

*subtilis*）着色变深，菌体变大，鲜有芽孢形成。Lambert等[[53]](#_bookmark103)提出Carvacrol通过改变细胞膜的通透性致使细菌死亡。Ultee等[[79,](#_bookmark127) [80]](#_bookmark128)研究发现Carvacrol能影响细胞膜，破坏磷脂双层，推开磷脂双层的脂肪酸链形成细胞膜通道使胞内的蛋白质、离子、糖类物质等胞内物质离开细胞质，从而对蜡状芽胞杆菌进行抑制。

### **1.5** 本研究的目的和意义

稻瘟病和番茄灰霉病都是危害性非常大的真菌性病害，它们的防治目前为止还主要依靠化学防治，但是化学防治会造成严重的环境污染，并且在使用过程中会引起稻瘟病菌和番茄灰霉病菌产生抗药性，引起防治效果大大减弱。因此，出于可持续发展以及绿色化学的需要，植物源杀菌剂越来越受到人们的重视，它不仅不会造成环境污染，而且也不易使病菌产生抗药性。

本实验所用的药剂Carvacrol，经过去的研究表明，它是一种广谱的抗真菌剂及抗细菌剂，对人体无毒、无过敏。目前Carvacrol对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌的抑菌

活性的研究还没有，对其作用机制的研究更是知之甚少。再加上Carvacrol多方面的优越性，将其开发为农业杀菌剂，必将发挥重要作用。本论文首先用不同浓度的

Carvacrol对离体条件下的稻瘟病菌和番茄灰霉病菌进行了抑菌活性的测定，然后采用光镜、电镜技术，在细胞及亚细胞水平研究Carvacrol处理后菌丝形态及超微结构的变化；最后，通过生物化学的方法对菌体细胞的生理生化指标进行测定，为揭示

Carvacrol抑制稻瘟病菌和番茄灰霉病菌生长的抑菌机制奠定基础，也为Carvacrol应用农业生产实践提供理论依据。

## **2** 材料与方法

### **2.1** 试验材料

#### **2.1.1** 供试病原菌

稻瘟病菌（*Magnaprothe oryzae*）、番茄灰霉病菌（*Botrytis cinerea*）均为云南农业大学农药与化学生态实验室保存菌种。

#### **2.1.2** 供试药剂

99%的Carvacrol原药（aladdin）；考马斯亮蓝G-250（上海化学试剂公司）；牛血清蛋白（生化试剂，上海伯奥生物科技有限公司）；96%麦角甾醇标准品（Sigma公司）；几丁质（北京拜尔迪生物科技有限公司）；对-二甲基氨基苯甲醛（DMAB）（梯希爱上海化成工业发展有限公司）；N-乙酰葡萄糖胺（北京拜尔迪生物科技有限公司）；Na2HPO4.12H2O（AR）（天津市风船化学试剂科技有限公司）；NaH2PO4.2H2O（AR）

（天津市风船化学试剂科技有限公司）；KOH（AR）（天津化学试剂有限公司）；KCl

（AR）（成都金ft化学试剂有限公司）；NaOH（AR）（天津化学试剂有限公司）；甲醇（AR）（利安隆博华天津医药化学有限公司）；丙酮（AR）（上海化学试剂一厂）；乙醇（AR）（天津市化学试剂三厂）；磷酸（AR）（天津市化学试剂三厂）；氯仿（AR）

（重庆川东化工有限公司）；石油醚（AR）（天津市化学试剂有限公司）；浓盐酸（AR）

（西陇化工股份有限公司）；冰醋酸（AR）（广东光华科技股份有限公司）；硼酸（AR）

（汕头市西陇化工工厂有限公司）；30%过氧化氢（AR）（天津市风船化学试剂科技有限公司）；透射电镜用戊二醛、锇酸、环氧树脂Epon812、醋酸铀、柠檬酸铅。

#### **2.1.3** 供试培养基

燕麦培养基：称取50g燕麦片，加水1000mL，煮沸30min，用纱布过滤后补足水至1000mL，加入20g蔗糖和20g琼脂粉，加热使琼脂溶化后，分装灭菌（121℃，

30min），备用。

PDA培养基：取200g洗净去皮的马铃薯切成小块，加1000mL蒸馏水煮沸半小时，用纱布过滤除去马铃薯，加入15g琼脂粉和15g葡萄糖，加热使琼脂溶化后，分装灭菌（121℃, 30min），备用。

#### **2.1.4** 主要仪器设备

恒温培养箱（HG303-3型，南京实验仪器厂制造）；超净工作台（SW-CJ系列，苏州安泰空气技术有限公司）；立式压力蒸汽灭菌器（LDZX型，上海申安医疗器械

厂）；电子天平（AL104型，梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司）；智能光照培养箱（MGC-300A，上海一恒科学仪器有限公司）；电导率仪（DDS-11A，上海虹益仪器仪表有限公司）；磁力搅拌机（HR2850, PHILIPS）；冷冻离心机（2-16KL, SIGMA）；高速台式微量冷冻离心机（CT15E, HIMAC）；高效液相色谱仪（Agilent 1260 Infinity, Agilent Technologies）；旋转蒸发仪（R-114型，瑞士Buchi有限公司）；徕卡荧光显微镜（LEICA DM2000，徕卡仪器有限公司）；扫描电子显微镜（KYKY-EM3200，北京科学仪器厂）；透射电子显微镜（JEM-1200EX II, JEOL）；紫外可见分光光度计

（ultrospec 6300 *pro*, Amersham Biosciences）；恒温水浴锅（HH-S26S，金坛市大地自动化仪器厂）等。

### **2.2** 试验方法

#### **2.2.1** **Carvacrol**对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌的抑菌活性

##### **2.2.1.1** **Carvacrol**对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌菌丝生长的影响

采用菌丝生长速率法[[81]](#_bookmark129)测定Carvacrol对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌菌丝生长的抑制作用。将已经活化的两菌种分别接在燕麦培养基和PDA培养基上，分别于28℃和

25℃培养7 d，用打孔器将其打成直径为5 mm的菌饼，接种于含系列浓度Carvacrol的培养基平板中间，每处理设置3次重复，设不加药但含等量有机溶剂的培养基平板做对照。分别于28℃和25℃下黑暗培养，3 d之后待对照组开始生长时观察菌丝生长情况。用十字交叉法测量菌落直径，取其平均值，按以下公式计算Carvacrol对病菌菌丝生长的抑制率。将菌丝生长抑制率换算成抑制机率值（Y），药剂浓度换算成浓度对数（X），求出回归方程y=ax+b，计算出相关系数（r）、EC50值及95%置信限。

菌丝生长抑制率%=（1-处理菌落直径-菌饼直径）×100

对照菌落直径-菌饼直径

##### **2.2.1.2** **Carvacrol**对稻瘟病菌孢子萌发的影响

Ⅰ稻瘟病菌孢子悬浮液的制备

在50 mL三角瓶中加入25 mL燕麦液体培养基，放入10-20粒直径为5 mm的玻璃珠，灭菌冷却后，接种活化的稻瘟病菌菌丝块，28℃，150 rpm摇体培养3d。用移液抢移取200 uL菌液至燕麦培养基平板上，涂布均匀后放置在28℃恒温箱中培养，待平板上菌丝长满后（约7 d），在无菌条件下用钥匙刮除平板上菌丝，然后置于28℃光照培养箱中光照培养约3-4 d后，产孢，每皿用5 mL蒸馏水洗下孢子，用血球计

数板测定稻瘟病菌孢子的浓度。用无菌水将孢子浓度调节到1×10 5个/mL，备用[[82]](#_bookmark130)。

ⅠⅠ测定方法

采用凹玻片上孢子萌发法[[83]](#_bookmark131)测定Carvacrol对稻瘟病菌分生孢子萌发的抑制作用。将上述孢子悬浮液与系列浓度药剂等体积混合，配成含240 mg•L-1、120 mg•L-1、60 mg•L-1、30 mg•L-1、15 mg•L-1药剂的孢子悬浮液。取40uL滴于凹玻片上，以加有机溶剂丙酮的作为对照，将凹玻片置于大平皿中，加盖后28℃保湿培养，每隔2h在普通光学显微镜下观察孢子的萌发情况。发芽标准采用发芽管长度超过孢子短直径长度的一半为已经萌发的孢子。每次观察100个孢子，重复3次。按以下公式计算孢子萌发率。

孢子萌发率(%) =萌发孢子数×100

总孢子数

##### **2.2.1.3** **Carvacrol**对番茄灰霉病菌孢子萌发的影响

Ⅰ番茄灰霉病菌孢子悬浮液的制备

将番茄灰霉病菌的菌饼接到PDA培养基平板上，25℃黑暗培养，待菌丝长满培养皿后，在20℃培养箱中培养5 d，可产生大量孢子。用无菌水洗下孢子，用灭过菌的纱布过滤除去菌丝获得孢子悬浮液。用血球计数板测定灰霉菌分生孢子的浓度，用无菌水将孢子浓度调整为1×10 5个/mL，备用[[84]](#_bookmark132)。

ⅠⅠ测定方法

采用凹玻片上孢子萌发法[[83]](#_bookmark131)测定Carvacrol对番茄灰霉病菌分生孢子萌发的抑制作用。将上述孢子悬浮液与系列浓度药剂等体积混合，配成含100 mg•L-1、50 mg•L-1、25 mg•L-1、12.5 mg•L-1、6.25 mg•L-1、3.125 mg•L-1药剂的孢子悬浮液。取40uL滴于凹玻片上，以加有机溶剂丙酮的作为对照，将凹玻片置于大平皿中，加盖后24℃保湿培养，每隔2 h在普通光学显微镜下观察孢子的萌发情况。发芽标准采用发芽管长度超过孢子短直径长度的一半为已经萌发的孢子。每次观察100个孢子，重复3次。按以下公式计算孢子萌发率。

孢子萌发率(%) =萌发孢子数×100

总孢子数

#### **2.2.2** **Carvacrol**处理稻瘟病菌和番茄灰霉病菌菌丝的形态观察

##### **2.2.2.1** 光学显微镜观察

将2.2.1.1培养的稻瘟病菌和番茄灰霉病菌的各处理和对照菌落，分别于28℃和

25℃下培养，分别培养7 d和6 d之后，挑取菌落边缘的菌丝体制成玻片标本，在徕卡荧光显微镜下观察不同浓度的Carvacrol对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌菌丝形态的影响[[33]](#_bookmark86)。

##### **2.2.2.2** 扫描电子显微镜（**SEM**）观察

在含系列浓度Carvacrol的燕麦培养基和PDA培养基平板上铺一层灭菌的玻璃纸，并设对照，将稻瘟病菌和番茄灰霉病菌菌饼接于平板中间，培养7 d后，将玻璃纸剪成小块粘贴在样品台上，在样品和样品台表面喷镀上一层金属膜，于扫描电镜下观察拍照[[85]](#_bookmark133)。

##### **2.2.2.3** 透射电子显微镜（**TEM**）观察

Ⅰ试剂配制

0.025M磷酸缓冲液（pH=6.8）的配制：溶液a: 称取0.895 g Na2HPO4.12H2O，用蒸馏水溶至100 mL；溶液b: 称取0.39g NaH2PO4.2H2O，用蒸馏水溶至100 mL. 然后取溶液a 49 mL，溶液b 51 mL，混匀即得0.025M, pH=6.8的磷酸缓冲液，常温下放置备用。

ⅠⅠ制样方法

将2.2.1.1培养的稻瘟病菌和番茄灰霉病菌的各处理和对照菌落，分别于28℃和

25℃下培养，分别于8 d和6 d后取样。在菌丝边缘内部取数个0.1cm×0.5cm大小的长方形小块。于4℃下，先用4%的戊二醛（磷酸缓冲液，pH6.8, 0.025M）固定12小时，随后将样品用磷酸缓冲液冲洗4-6次，每次15 min；再用2%的锇酸将样品在

4℃下固定2小时，并用磷酸缓冲液冲洗4次，每次15 min。之后用不同浓度的乙醇水溶液脱水（30%乙醇中15min、50%中15min、70%中15min、90%中15min、100%中三次, 每次15min）。用环氧树脂Epon812包埋并在60℃下聚合48小时。聚合后的样品经过修块、超薄切片，醋酸双氧铀（25min）、柠檬酸铅（15min）染色后，在透射电镜观察下观察拍照[[85]](#_bookmark133)。

#### **2.2.3** **Carvacrol**处理稻瘟病菌和番茄灰霉病菌的生理生化测定

##### **2.2.3.1** **Carvacrol**对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌菌丝细胞膜通透性的影响

Ⅰ菌丝体培养

将稻瘟病菌和番茄灰霉病菌菌种分别在燕麦培养基和PDA培养基上培养7 d，用直径5 mm的打孔器沿菌落边缘打取一定数量的菌饼，分别移入含50mL燕麦液体培养基和PD培养基的三角瓶中，分别于28℃和25℃，150r/min振荡培养7 d。将菌丝团取出，在超净工作台上用灭菌去离子水冲洗，洗掉菌丝体上的培养基，并用布氏漏斗抽滤，收集菌丝体[[86]](#_bookmark134)。

ⅠⅠ电导率测定

称取1 g菌丝加到50 mL灭菌的去离子水中，加入Carvacrol至系列浓度梯度，以无菌的去离子水加溶剂为对照，分别于28℃和25℃，150 r/min振荡培养，在室温下，于0 min、5 min、10 min、15 min、30 min、60 min、90 min、120 min、180 min时测定电导率值，重复3次[[87,](#_bookmark135) [88]](#_bookmark136)。

##### **2.2.3.2** **Carvacrol**对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌可溶性蛋白含量的影响

Ⅰ菌丝体培养同2.2.3.1

ⅠⅠ酶液制备

分别称取定量稻瘟病菌和番茄灰霉病菌菌丝5 g，用燕麦液体培养基和PD培养基悬浮，加入Carvacrol至系列浓度梯度，每个处理重复3次。在处理后的4、8、16、

32、64 h后，过滤收集菌丝，用布氏漏斗抽干菌体表面的培养液和水分，并用磷酸缓冲液（0.2M, pH=7.5）冲洗两次。称取0.5 g菌丝，加入2 mL磷酸缓冲液于研钵中，在冰浴中研磨至糊状，用磷酸缓冲液补足至10 mL，于4℃下离心（12000 r/min）15 min，取上清液于-20℃冰箱中保存备用[[89]](#_bookmark137)。

ⅠⅠⅠ试剂配制

标准蛋白质溶液（1 mg/mL）：准确称取100 mg牛血清蛋白，在100 mL容量瓶中加蒸馏水至刻度，溶后分装，-20℃冰箱保存。

考马斯亮蓝G-250：将100 mg考马斯亮蓝G-250溶于50 mL95%的乙醇中，加入100 mL85%的磷酸，加蒸馏水稀释到1000 mL，置于棕色试剂瓶中，在4℃条件下保存备用。

0.2M磷酸缓冲液（pH=7.5）的配制：溶液a: 称取7.16 g Na2HPO4.12H2O，用蒸馏水溶至100 mL；溶液b: 称取3.12 g NaH2PO4.2H2O，用蒸馏水溶至100 mL. 然后取溶液a 84 mL，溶液b 16 mL，混匀即得0.2 M, pH=7.5的磷酸缓冲液，常温下放置备用。

Ⅳ测定方法

a. 标准曲线的绘制

取7支试管，分别标注为0-6号试管，分别加入1 mg/mL标准蛋白溶液0.0 mL、

0.1 mL、0.2 mL、0.3 mL、0.4 mL、0.5 mL、0.6 mL，而后依次加入蒸馏水1.0 mL、

0.9 mL、0.8 mL、0.7 mL、0.6 mL、0.5 mL、0.4 mL，分别配制成0、0.1 mg•mL-1、

0.2 mg•mL-1、0.3 mg•mL-1、0.4 mg•mL-1、0.5 mg•mL-1、0.6 mg•mL-1牛血清蛋白溶液。再向每支试管中加入5 mL考马斯亮蓝G-250溶液，摇匀、静止5 min后，用分光光度计测定其在595 nm处的吸光值。使用origin软件，以各管的标准蛋白浓度为横坐标，以吸光度为纵坐标绘出标准曲线[[90]](#_bookmark138)。

b. 样品蛋白含量的测定

采用Bradford（1976）的考马斯亮蓝G-250比色法[[60]](#_bookmark110)测定菌丝中可溶性蛋白质的含量。取上清液0.5 mL，至5mL离心管中，再加入2.5 mL考马斯亮蓝G-250，摇匀，静止5 min，以0.5 mL磷酸缓冲液加蒸馏水为空白对照，于波长595 nm下测定OD值，每样品重复3次。通过标准曲线查得蛋白质的含量，根据以下公式计算样品中蛋白质的含量：

样品中蛋白质含量（mg/g）=

C：查标准曲线值（ug）；VT：提取液总体积（mL）；VS：测定时加样量（mL）；WF：样品鲜重（g）。

*C**VT*

*VS* *WF*1000

##### **2.2.3.3** **Carvacrol**对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌几丁质酶活性的影响

Ⅰ菌丝体培养及酶液制备同2.2.3.1和2.2.3.2

ⅠⅠ试剂配制[[91]](#_bookmark139)

1%对二甲基氨基苯甲醛（DMAB）的制备：称取1 g对二甲基氨基苯甲醛，加入少量冰醋酸溶解，再加1.25 mL浓盐酸，最终用冰醋酸定容至100 mL，置4℃冰箱保存。

0.8 mol/L硼酸钾缓冲液（pH=9.1）的制备：准确称取KOH固体10.92 g，溶于蒸馏水中并定容到20 mL；精确称取4.945 g硼酸（H3BO3），然后溶于蒸馏水中并定容到70 mL；10 mL KOH溶液加入到预先配制好的硼酸溶液中，滴加KOH溶液的同时测定溶液的pH值，当pH值缓慢调到9.1时，加入蒸馏水定容到100 mL。

胶状几丁质的制备：称取粉末状几丁质5.0 g，缓慢加入到盛有200 mL（≤4℃）预冷浓盐酸的烧杯中，在磁力搅拌器上剧烈搅拌，待几丁质粉末均匀分散后，在水浴中轻度搅拌并缓慢加热至37℃，混合物的粘度迅速增加，3-5 min后粘度开始下降，混合物逐渐变得清凉。当几丁质基本上溶解完毕时，用玻璃棉过滤，将滤液加入到预冷（≤4℃）的2000 mL的去离子水中继续搅拌，5-8 min后，烧杯中的溶液有沉淀出现，溶液变得混浊，30 min后停止搅拌，将搅拌后的悬浮液于冰箱（≤4℃）沉淀过夜。吸去上清液，剩余部分用双层中性滤纸抽虑，沉淀再用水洗涤3次，待pH值在5.0以上时，加数滴1 mol/L NaOH使溶液呈中性。将上述中性沉淀物加到200 mL的去离子水中，在磁力搅拌器下剧烈搅拌，至溶液悬浮，即得到所需的几丁质胶体溶液。取该溶液5 mL，105℃烘箱干燥至衡重，测定溶液几丁质的含量（胶体几丁质溶液的几丁质含量为：mg/mL），并将胶体几丁质溶液浓度稀释为1%。

ⅠⅠⅠ测定方法

a. 标准曲线的绘制

称取N-乙酰葡萄糖胺3 mg溶于少量去离子水中，然后定容到3 mL，配置成1 mg•mL-1的N-乙酰葡萄糖胺母液，分别取0 mL、0.5 mL、0.4 mL、0.3 mL、0.2 mL、

0.1 mL、0.05 mL N-乙酰葡萄糖胺母液于不同试管中，再分别加入1 mL、0.5 mL、0.6

mL、0.7 mL、0.8 mL、0.9 mL、0.95 mL的去离子水使溶液总体积为1 mL，混匀后，取0.2mL各种上述N-乙酰葡萄糖胺溶液，加入0.1 mL硼酸钾（0.8 mol/L），沸水浴 3

min后，冷却。继续加入3 mL1%的DMAB（对-二甲氨基苯甲醛）溶液，36℃保温20 min，冷却后迅速在544 nm下测定其吸光值。使用origin软件，以N-乙酰葡萄糖胺浓度为横坐标，以吸光度为纵坐标绘出标准曲线。

b. 样品几丁质酶活性的测定[[92,](#_bookmark140) [93]](#_bookmark141)

取0.3 mL上清液与0.2 mL胶状几丁质混合后，37℃下保温1 h，煮沸5 min灭活，

对照管保温前先煮沸5 min灭活，5000 rpm离心10 min，取上清液0.2 mL，加0.1 mL硼酸钾（0.8M），沸水浴3 min立即冷却，加3 mL 1%的DMAB溶液，36℃保温20 min，立即冷却，于波长544 nm处测定其吸光值。同时以N-乙酰葡萄糖胺（D-GlcNAc）绘制标准曲线，以反应前后N-乙酰葡萄糖胺含量的变化表示酶活性的变化。

##### **2.2.3.4** **Carvacrol**对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌**N-**乙酰葡萄糖胺含量的影响

Ⅰ菌丝体培养及酶液制备同2.2.3.1和2.2.3.2

ⅠⅠ样品中N-乙酰葡萄糖胺含量的测定[[94]](#_bookmark142)

取酶液0.2 mL，再加0.1 mL硼酸钾（0.8 mol/L），沸水浴3 min后，立即冷却，加入3 mL 1%的DMAB溶液，36℃保温20 min，立即冷却，于波长544 nm处测定其吸光值。以N-乙酰葡萄糖胺（D-GlcNAc）绘制标准曲线作为参考。

##### **2.2.3.5** **Carvacrol**对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌过氧化氢酶（**CAT**）活性的影响

Ⅰ菌丝体培养及酶液制备同2.2.3.1和2.2.3.2

ⅠⅠ试剂配制

底物溶液的配制：用磷酸缓冲液把0.6 mL 30%过氧化氢稀释至100 mL。

0.2M磷酸缓冲液（pH=7.5）的配制：溶液a：称取7.16g Na2HPO4.12H2O，用蒸馏水溶至100 mL；溶液b：称取3.12g NaH2PO4.2H2O，用蒸馏水溶至100 mL。然后取溶液a 84 mL，溶液b 16 mL，混匀即得0.2M, pH=7.5的磷酸缓冲液，常温下放置备用。

ⅠⅠⅠ过氧化氢酶（CAT）活性测定

紫外吸收法[[95]](#_bookmark143)：取一支试管加入1.9 mL去离子水和1.0 mL底物溶液，25℃水浴

1 min，而后加入0.1 mL酶液，混匀，每处理3个重复。在240 nm下测1 min内的

OD值变化，设每min减少0.001 A240为一个CAT活力单位（U）。

##### **2.2.3.6** **Carvacrol**对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌麦角甾醇含量的影响

Ⅰ菌丝体培养同2.2.3.1。

ⅠⅠ样品溶液的制备[[96,](#_bookmark144) [97]](#_bookmark145)

称等量湿重的稻瘟病菌和番茄灰霉病菌菌丝置于含不同浓度药剂的150 mL无菌水中，每个样品重复处理3次，分别于28℃和25℃，150 r/min的条件下培养3 d。用同样的方法抽干菌丝上的培养液，分别称取0.5 g菌丝加入到10 mL甲醇和氯仿（3：

1）的混合液中匀浆，室温条件下静置过夜，依次加入水、氯仿和含有2. 0 mol/L的KCl

的0. 5 mol/L的磷酸缓冲液（pH 6.8）各10 mL，分层后，萃取氯仿相在旋转蒸发仪上60℃蒸干。加入含有1.4 mol/L的KOH的甲醇和乙醇(4: 1)混合液10 mL，60℃皂化1 h。加入水和石油醚（沸程60～90℃）各10 mL，萃取分层，取石油醚层在旋转

蒸发仪中浓缩、蒸干，所得沉淀用乙醇溶解，定容至10 mL，通过针筒式微孔滤膜过滤器（直径0.45 um）过滤，4℃冰箱贮存备用。

ⅠⅠⅠ试剂配制

0.5 M磷酸缓冲液（pH=6.8）的配制：溶液a: 称取17.907 g Na2HPO4.12H2O，用蒸馏水溶至100 mL；溶液b: 称取7.8 g NaH2PO4.2H2O，用蒸馏水溶至100mL. 然后取溶液a 49mL，溶液b 51 mL，混匀即得0.025M, pH=6.8的磷酸缓冲液，常温下放置备用。

Ⅳ麦角甾醇高效液相色谱分析条件[[96,](#_bookmark144) [97]](#_bookmark145)

色谱柱：100×4.6mm（Kinetex 2.6u C18）；填料：HYPERSLBDSC-18，5um；柱温：室温；流速：0.5mL/min；进样量：10uL；流动相：甲醇：水=95: 5；UV检测波长为282nm。

Ⅴ测定方法

a. 标准曲线绘制[[96,](#_bookmark144) [97]](#_bookmark145)

将麦角甾醇标准品配制成100、20、4、0.8、和0.16 mg•L-1系列浓度的溶液，按照上述分析条件进样分析。使用origin软件，以麦角甾醇浓度（mg•L-1）为横坐标，吸收峰面积（mAU·s）作为纵坐标，绘出标准曲线。

b. 样品中麦角甾醇含量的测定

按照上述的色谱条件测定菌丝提取液中麦角甾醇的峰面积，计算样品中麦角甾醇的浓度，并计算菌丝中麦角甾醇的含量。

## **3** 结果与分析

### **3.1** **Carvacrol**对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌的抑菌活性

#### **3.1.1** **Carvacrol**对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌菌丝生长的影响

Carvacrol对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌菌丝生长的抑制作用从外观上看（图3-1），随着Carvacrol浓度的增大，菌落直径变小，菌丝变得稀薄。

Carvacrol对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌菌丝生长的抑制效果存在着明显的剂量效应（表3-1、表3-2），即随着处理剂量的加大抑制效果增加，但Carvacrol对两种菌菌丝生长的抑制效果并不因处理时间的延长而增加，反而出现随处理时间的延长而抑制效果下降的趋势。出现这一趋势的原因，可能与病菌菌丝的生长量有关。尽管药剂对菌落直径增大起抑制作用，但只要菌丝生长不完全停止，处理的菌落直径仍然在增大，菌丝体生物量同样在增加。对每一菌丝细胞而言，基质中剂量一定的处理物，可能因菌丝细胞量的多寡而每一菌丝细胞所接受到的处理物剂量下降。

Carvacrol对两种病菌菌丝生长的毒力测定结果表明（表3-3），Carvacrol对稻瘟病菌6 d的EC50为36.07 mg•L-1；对番茄灰霉病菌5 d的EC50为10.65 mg•L-1.





**图3**-**1** **稻瘟病菌和番茄灰霉病菌经Carvacrol分别处理6 d、5 d后菌落Th长情况**

**Figure 3**-**1. The colony growth of** [***Magnaporthe oryzae***](http://www.baidu.com/link?url=DZBCWHnsRQ30w45frmEoxlJG6XmGwd6YVDWOjcS2DQVd-yfEqN0R2UM-HgPQhTvlpNSnd1HRHPL9jBZKosn_EaKH8aLxuuIb7AiQj_jYCJe) **and *Botrytis cinerea* treated with carvacrol for six days and five days respectively**

**表3**-**1** **Carvacrol对稻瘟病菌菌丝Th长的抑制率**

**Table 3**-**1. Inhibitory ratio of carvacrol on the hyphal growth of** [***Magnaporthe oryzae***](http://www.baidu.com/link?url=DZBCWHnsRQ30w45frmEoxlJG6XmGwd6YVDWOjcS2DQVd-yfEqN0R2UM-HgPQhTvlpNSnd1HRHPL9jBZKosn_EaKH8aLxuuIb7AiQj_jYCJe)

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **时间** |  | | | | |
|  | **120mg/L** | **90 mg/L** | **60 mg/L** | **30 mg/L** | **15 mg/L** |
| **3d** | **100±0.00d** | **100±0.00d** | **80.39±1.73c** | **60.29±1.35b** | **44.74±3.35a** |
| **4d** | **100±0.00d** | **100±0.00d** | **66.80±1.31c** | **48.34±1.35b** | **26.34±0.80a** |
| **5d** | **100±0.00d** | **100±0.00d** | **64.27±0.62c** | **44.67±0.77b** | **24.57±2.04a** |
| **6d** | **100±0.00 e** | **94.53±0.46d** | **56.88±1.45c** | **41.04±0.60b** | **22.56±0.70a** |
| **7d** | **100±0.00e** | **89.16±0.37d** | **50.50±1.65c** | **36.75±1.01b** | **18.29±0.73a** |
| **8d** | **100±0.00e** | **84.62±0.82d** | **49.15±0.37c** | **34.05±0.80b** | **17.38±1.00a** |

**菌丝生长抑制率（%）±SD**

**注：同行不同字母表示差异显著（*P*＜0.05）**

**表3-2** **Carvacrol对番茄灰霉病菌菌丝Th长的抑制率**

**Table** **3-2. Inhibitory ratio of carvacrol on the hyphal growth of*Botrytis cinerea***

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **时间** |  | | | | |
|  | **50mg/L** | **25mg/L** | **12.5 mg/L** | **6.25 mg/L** | **3.125 mg/L** |
| **3d** | **100±0.00d** | **100±0.00d** | **81.41±2.40c** | **48.18±3.68b** | **26.94±4.11a** |
| **4d** | **100±0.00d** | **100±0.00d** | **65.63±1.44c** | **27.90±0.91b** | **7.37±0.62a** |
| **5d** | **100±0.00e** | **91.61±0.60d** | **59.70±1.11c** | **19.57±1.23b** | **4.77±0.70a** |
| **6d** | **100±0.00e** | **89.08±0.23d** | **53.03±0.64c** | **15.13±1.42b** | **3.03±0.80a** |
| **7d** | **100±0.00e** | **87.97±0.22d** | **46.99±1.14c** | **11.01±0.50b** | **2.61±0.52a** |

**菌丝生长抑制率（%）±SD**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **供试病菌** | **毒力回归方程** | **相关系数 R** | **EC50（mg •L-1）** | **95%的置信限（mg •L-1）** |
| **稻瘟病菌** | **y=20.837x+0.491** | **0.980** | **36.065** | **8.996-6850.712** |
| **番茄灰霉病菌** | **y=26.25x-23.62** | **0.981** | **10.651** | **9.708-11.760** |

**注：同行不同字母表示差异显著（P＜0.05）表3-3 Carvacrol抑制供试病菌菌丝Th长的毒力Table 3-3 Toxicity of carvacrol to hypha growth**

#### **3.1.2** **Carvacrol**对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌孢子萌发的影响

Carvacrol对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌孢子萌发的抑制作用测定结果见图3-2、表3-4、表3-5。由图3-2可知，当Carvacrol浓度为120和240 mg•L-1，处理10 h后，稻瘟病菌孢子萌发率达到90%以上；当Carvacrol浓度为100和50 mg•L-1时，处理12 h后，番茄灰霉病菌孢子萌发率达到95%以上。表3-4、表3-5表明不同浓度Carvacrol对两种菌孢子萌发的影响呈现无规律变化。



**图3**-**2稻瘟病菌孢子和番茄灰霉病菌孢子经Carvacrol分别处理10 h、12 h后的萌发情况Figure 3**-**2. The spore germination of** [***Magnaporthe oryzae***](http://www.baidu.com/link?url=DZBCWHnsRQ30w45frmEoxlJG6XmGwd6YVDWOjcS2DQVd-yfEqN0R2UM-HgPQhTvlpNSnd1HRHPL9jBZKosn_EaKH8aLxuuIb7AiQj_jYCJe) **and *Botrytis cinerea* after treated with carvacrol for ten hours and twelve respectively**

**表3-4** **经Carvacrol处理后稻瘟病菌孢子的萌发率**

**Table 3-4. The spore germination ration of** [***Magnaporthe oryzae***](http://www.baidu.com/link?url=DZBCWHnsRQ30w45frmEoxlJG6XmGwd6YVDWOjcS2DQVd-yfEqN0R2UM-HgPQhTvlpNSnd1HRHPL9jBZKosn_EaKH8aLxuuIb7AiQj_jYCJe) **after treated with carvacrol**

**孢子萌发率（%）**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **240 mg •L-1** | **120 mg •L-1** | **60 mg •L-1** | **30 mg •L-1** | **15 mg •L-1** | **CK** |
| **2h** | **13.01±0.58b** | **8.89±0.53a** | **18.58±0.30c** | **23.62±0.20d** | **13.50±0.290b** | **12.23±0.54b** |
| **4h** | **47.52±1.39cd** | **26.76±2.01a** | **55.38±1.12e** | **48.77±1.68d** | **45.48±0.88c** | **36.33±0.76b** |
| **6h** | **78.38±2.10c** | **77.58±3.96c** | **62.40±1.26b** | **65.56±3.15b** | **55.83±0.92a** | **74.33±0.44c** |
| **8h** | **79.39±4.24b** | **76.96±3.06b** | **70.43±1.40a** | **74.63±1.60ab** | **71.00±1.00a** | **80.12±0.68b** |
| **10h** | **92.19±2.47bc** | **95.32±2.13c** | **86.65±2.54a** | **85.22±1.55a** | **91.17±1.04b** | **100.00±0.00d** |
| **12h** | **93.56±3.23ab** | **93.04±4.64 a** | **93.95±2.00ab** | **98.17±0.76ab** | **98.93±0.16ab** | **100.00±0.00b** |

**时间**

**注：同行相同字母表示差异不显著（P＞0.05）；不同字母表示差异显著（P＜0.05）。表3-5经Carvacrol处理后番茄灰霉病菌孢子的萌发率**

**Table** **3-5. The spore germination ration of*Botrytis cinerea* after treated with carvacrol**

**孢子萌发率（%）**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **100 mg •L-1** | **50 mg •L-1** | **25 mg •L-1** | **12.5 mg •L-1** | **6.25 mg •L-1** | **CK** |
| **2h** | **15.82±4.85a** | **30.84±0.46c** | **21.08±0.28ab** | **21.06±0.15ab** | **27.89±6.03bc** | **34.41±5.41c** |
| **4h** | **26.54±9.57a** | **37.65±2.17ab** | **27.70±0.67a** | **37.15±1.41ab** | **42.71±3.49b** | **53.95±5.91c** |
| **6h** | **32.68±3.78a** | **50.93±8.42bc** | **41.59±13.56ab** | **39.52±2.18ab** | **68.61±1.48d** | **60.11±0.77cd** |
| **8h** | **53.90±8.48ab** | **61.45±10.30ab** | **49.88±11.50a** | **54.41±13.11ab** | **64.26±6.79ab** | **76.87±6.43b** |
| **10h** | **76.77±2.97ab** | **73.19±5.52a** | **78.64±2.58ab** | **85.08±4.61ab** | **79.08±7.89ab** | **87.60±3.71b** |
| **12h** | **98.37±0.79a** | **97.71±2.38a** | **95.85±3.94a** | **97.61±2.34a** | **97.73±1.56a** | **100.00±0.00a** |

**时间**

**注：同行相同字母表示差异不显著（P＞0.05）；不同字母表示差异显著（P＜0.05）。**

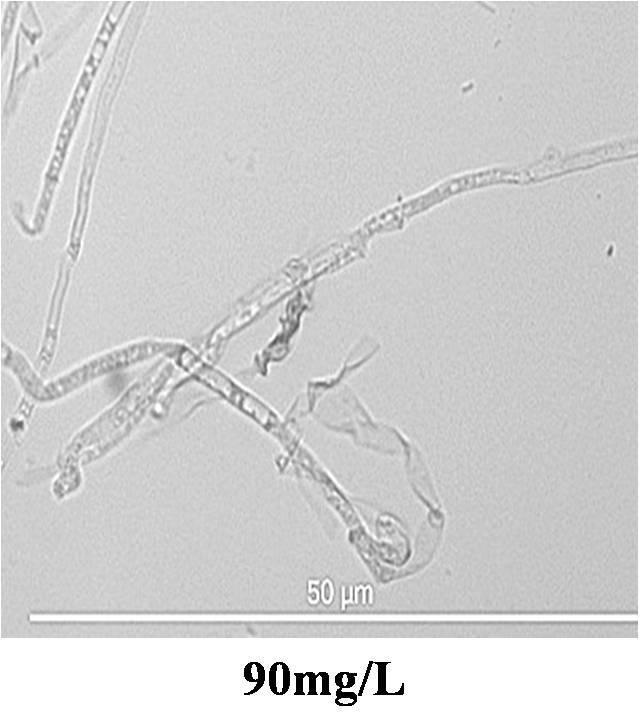
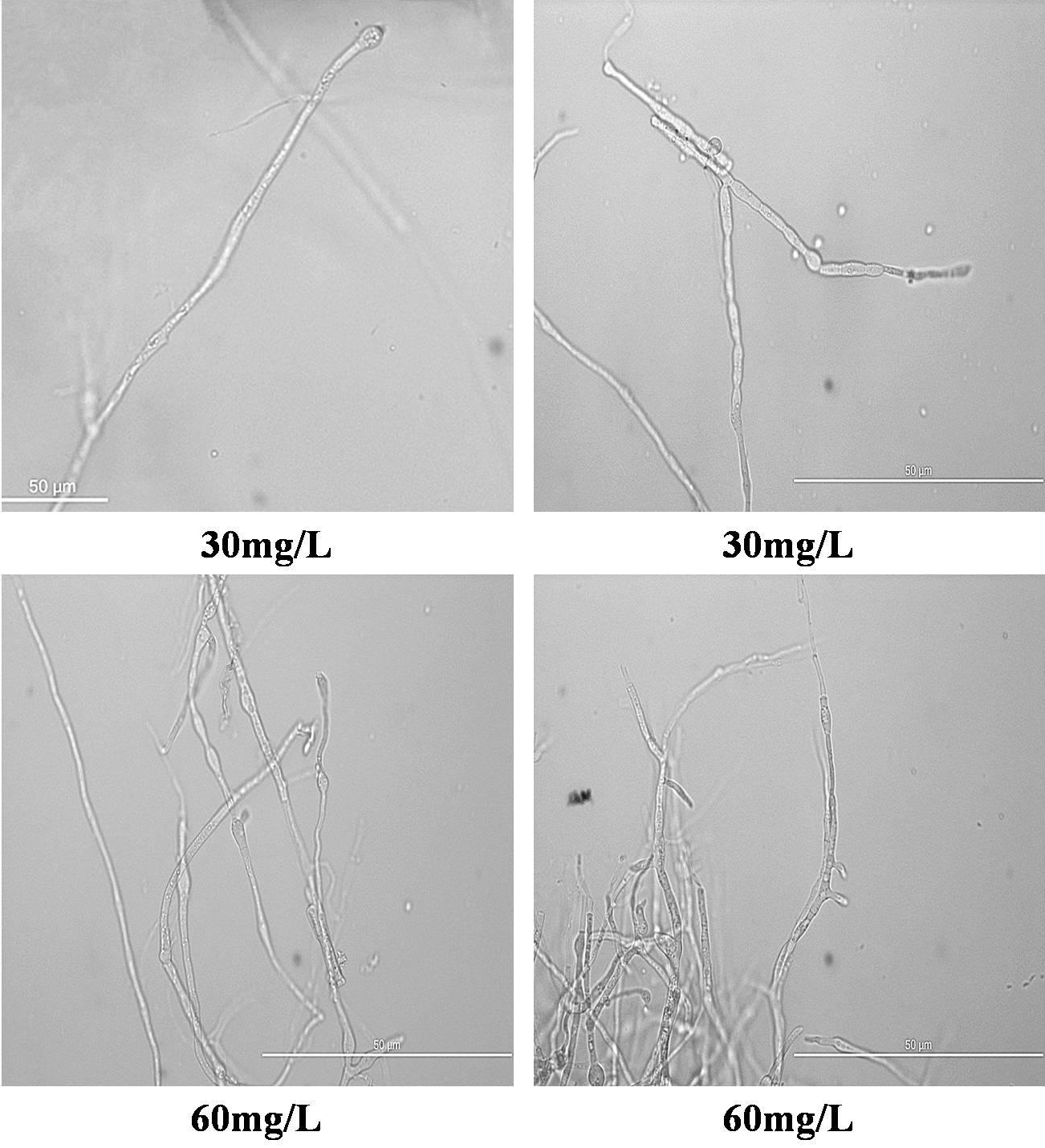
### **3.2** **Carvacrol**处理稻瘟病菌和番茄灰霉病菌菌丝的形态观察

#### **3.2.1** 光学显微镜观察结果

##### **3.2.1.1** 光学显微镜观察稻瘟病菌菌丝形态

显微观察（图3-3）可以看出，正常生长的菌丝粗细均匀，原生质和核等内含物分布均匀；当Carvacrol浓度为7.5 mg•L-1时，菌丝扭曲、内含物固缩、出现液泡；当Carvacrol浓度为15 mg•L-1时，菌丝粗细不均；当Carvacrol浓度为30 mg•L-1时，菌丝局部和顶端膨大；当Carvacrol浓度为60 mg•L-1时，菌丝膨大数增多，菌丝分支增多；当Carvacrol浓度为90 mg•L-1时，内含物流出，出现空管。





**图3**-**3** **经Carvacrol处理后稻瘟病菌菌丝的形态**

**Figure 3**-**3. Mycelia morphological character of** [***Magnaporthe oryzae***](http://www.baidu.com/link?url=DZBCWHnsRQ30w45frmEoxlJG6XmGwd6YVDWOjcS2DQVd-yfEqN0R2UM-HgPQhTvlpNSnd1HRHPL9jBZKosn_EaKH8aLxuuIb7AiQj_jYCJe) **after treated with carvacrol**

##### **3.2.1.2** 光学显微镜观察番茄灰霉病菌菌丝形态

显微观察（图3-4）可以看出，正常菌丝内含物分布均匀，分枝的形成距菌丝顶端有一定的距离；当Carvacrol浓度为3.125 mg•L-1时，内含物分布不均、固缩，出现液泡；当Carvacrol浓度为6.25 mg•L-1时，菌丝内含物流出，出现空管；当Carvacrol浓度为12.5 mg•L-1时，菌丝分支增多，分枝间距变短。





**图3-4** **经Carvacrol处理后番茄灰霉病菌菌丝的形态**

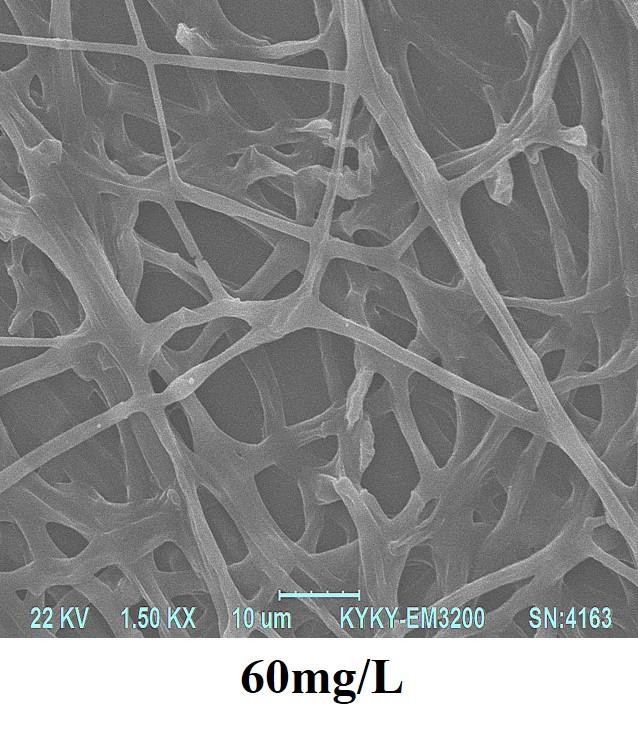
**Figure** **3-4. Mycelia morphological character of*Botrytis cinerea* after treated with carvacrol**

#### **3.2.2** 扫描电镜观察结果

##### **3.2.2.1** 扫描电镜观察稻瘟病菌菌丝形态

由图3-5可知，正常稻瘟病菌菌丝顶端尖细，菌丝表面光滑而饱满，伸展良好，分枝的形成距菌丝顶端有一定的距离；当Carvacrol浓度为30 mg•L-1时，顶端、局部膨大，菌丝溢缩、扭曲；当Carvacrol浓度为60 mg•L-1时，菌丝分枝增多，分枝间距变短，并出现菌丝断裂的现象。





**图3**-**5** **经Carvacrol处理后稻瘟病菌菌丝的形态**

**Figure 3**-**5. Mycelia morphological character of** [***Magnaporthe oryzae***](http://www.baidu.com/link?url=DZBCWHnsRQ30w45frmEoxlJG6XmGwd6YVDWOjcS2DQVd-yfEqN0R2UM-HgPQhTvlpNSnd1HRHPL9jBZKosn_EaKH8aLxuuIb7AiQj_jYCJe) **after treated with carvacrol**

##### **3.2.2.2** 扫描电镜观察番茄灰霉病菌菌丝形态

由图3-6可知，正常番茄灰霉病菌菌丝表面光滑饱满，顶端尖细；当Carvacrol浓度为6.25 mg•L-1时，菌丝粗细不一，出现菌丝溢缩、扭曲的现象；当Carvacrol浓度为12.5 mg•L-1时，菌丝分枝增多，分枝及分枝间变短，菌丝顶端缺陷，并且出现菌丝局部膨大和断裂的现象；当Carvacrol浓度为25 mg•L-1时，菌丝溢缩、扭曲现象更加严重，顶端畸形，菌丝断裂现象严重。







**图3-6** **经Carvacrol处理后番茄灰霉病菌菌丝的形态**

**Figure** **3-6. Mycelia morphological character of*Botrytis cinerea* after treated with carvacrol**

#### **3.2.3** 透射电镜观察结果

##### **3.2.3.1** 透射电镜观察稻瘟病菌菌丝形态

由图3-7可以看出，正常菌丝细胞壁完整，细胞结构紧密，胞质分布比较均匀；浓度为60 mg•L-1的Carvacrol处理后，细胞周围有分泌物，出现大液泡，内含物流出，出现空腔，菌体细胞壁部分模糊不清，部分断裂；浓度为90 mg•L-1的Carvacrol处理后，细胞壁完全模糊不清。





**图3**-**7** **经Carvacrol处理后稻瘟病菌菌丝的形态**

**Figure 3**-**7. Mycelia morphological character of** [***Magnaporthe oryzae***](http://www.baidu.com/link?url=DZBCWHnsRQ30w45frmEoxlJG6XmGwd6YVDWOjcS2DQVd-yfEqN0R2UM-HgPQhTvlpNSnd1HRHPL9jBZKosn_EaKH8aLxuuIb7AiQj_jYCJe) **after treated with carvacrol**

##### **3.2.3.2** 透射电镜观察番茄灰霉病菌菌丝形态

由图3-8可以看出，正常菌丝细胞壁完整，细胞结构紧密，胞质分布比较均匀；浓度为12.5 mg•L-1的Carvacrol处理后，菌体细胞开始发生固缩，引起质壁分离，内含物流出，出现空腔，菌体细胞壁部分模糊不清；浓度为25 mg•L-1的Carvacrol处理后，细胞壁完全模糊不清。



**图3-8** **经Carvacrol处理后番茄灰霉病菌菌丝的形态**

**Figure** **3-8. Mycelia morphological character of*Botrytis cinerea* after treated with carvacrol**

### **3.3** **Carvacrol**处理稻瘟病菌和番茄灰霉病菌的生理生化测定

#### **3.3.1** **Carvacrol**对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌菌丝细胞膜通透性的影响

培养液电导率的改变可以反映细胞膜渗透性的改变。Carvacrol引起稻瘟病菌和番茄灰霉病菌菌丝电导率变化的测定结果如图3-9。结果表明，与对照组相比，在

Carvacrol处理后电导率明显增大，并且随着Carvacrol作用时间的延长，电导率逐渐增大，说明菌丝内有电解质渗漏。

稻瘟病菌菌丝经Carvacrol处理15 min后，电导率明显增加，在低浓度15 mg•L-1，处理180 min后，电导率较对照组就增加了72.44%。

番茄灰霉病菌菌丝，在较低浓度下电导率变化较为缓慢，与对照组差别不大，但仍较对照高，当浓度达25 mg•L-1和50 mg•L-1时，电导率明显增加；当Carvacrol浓度为50 mg•L-1，处理180 min后，电导率增加了90.48%。

此结果与上述光学显微镜观察到菌丝空管、扫描电子显微镜观察到菌丝干瘪、透射电镜观察到菌丝细胞边缘出现内含物、甚至空腔，结果具有一致性。

**CK**

**15mg.L-1**

**30mg.L-1**

**60mg.L-1**

**90mg.L-1**

**120mg.L-1**

**20**

**18**

**16**

**14**

**12**

**Conductivity**

**10**

**8**

**6**

**4**

**2**

**0**

**0Min 5min 10min15min30min60min90min120mi1n80min --**

**Time(min)**

**35**

**CK**

**3.125mg.L-1**

**6.25mg.L-1**

**25mg.L-1**

**50mg.L-1**

**12.5mg.L-1**

**30**

**25**

**20**

**Conductivity**

**15**

**10**

**5**

**0**

**-5**

**0Min 5min 10min15min30min60min90min120mi1n80min --**

**Time( min)**

**图3-9** **Carvacrol对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌菌丝细胞电解质渗漏的影响**

**Figure 3-9. Effect of the carvacrol on cellular leakage of hyphae of** [***Magnaporthe oryzae***](http://www.baidu.com/link?url=DZBCWHnsRQ30w45frmEoxlJG6XmGwd6YVDWOjcS2DQVd-yfEqN0R2UM-HgPQhTvlpNSnd1HRHPL9jBZKosn_EaKH8aLxuuIb7AiQj_jYCJe) **and**

***Botrytis cinerea***

#### **3.3.2** **Carvacrol**对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌可溶性蛋白含量的影响

Carvacrol对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌菌丝体内可溶性蛋白含量的变化如图3-11。结果表明，经Carvacrol处理后，两种菌菌丝体的可溶性蛋白含量呈下降趋势。

当Carvacrol浓度为120 mg•L-1，处理64 h后，稻瘟病菌菌丝可溶性蛋白的含量下降最明显，较对照下降了71.76%。

当Carvacrol浓度为50 mg•L-1，处理64 h后，番茄灰霉病菌菌丝可溶性蛋白的含量下降最明显，较对照下降了62.06%。表明Carvacrol可抑制两种菌蛋白质的合成，导致对两种菌菌丝的生长产生抑制作用。

**y=8.1x+0.004 R2=0.99993**

**5**

**4**

**3**

**OD-value**

**2**

**1**

**0**

**0.1** 0.2 0.3 0.4 0.5 0.6

**concentration(mg/mL)**

**图3-10** **牛血清蛋白标准曲线**

**Figure** **3-10. standard curve of bovine serum albumin**

**3.5**

**3.0**

**soluble protein content(mg/g)**

**2.5**

**2.0**

**1.5**

**1.0**

**0.5**

**CK**

**15Mg/L 30mg/L 60mg/L 90mg/L 120mg/L**

**4H** 8h 16h 32h 64h Time(h)

**10.0**

**9.5**

**9.0**

**soluble protein content(mg/g)**

**8.5**

**8.0**

**7.5**

**7.0**

**6.5**

**6.0**

**5.5**

**5.0**

**4.5**

**4.0**

**3.5**

**3.0**

**CK**

**3.125mg/L**

**6.25mg/L**

**12.5Mg/L 25mg/L 50mg/L**

**4H** 8h 16h 32h 64h Time(h)

**图3-11** **Carvacrol对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌可溶性蛋白含量的影响**

**Figure 3-11. Effect of the carvacrol on protein content of** [***Magnaporthe oryzae***](http://www.baidu.com/link?url=DZBCWHnsRQ30w45frmEoxlJG6XmGwd6YVDWOjcS2DQVd-yfEqN0R2UM-HgPQhTvlpNSnd1HRHPL9jBZKosn_EaKH8aLxuuIb7AiQj_jYCJe) **and *Botrytis cinerea***

#### **3.3.3** **Carvacrol**对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌几丁质酶活性的影响

Carvacrol对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌几丁质酶活性的影响如图3-13。结果表明，经Carvacrol处理后，两种菌几丁质酶的活性先升高后降低。

稻瘟病菌在16 h内，随着Carvacrol作用时间的延长，几丁质酶活性逐渐升高；在16 h后，酶活性有一定的降低，并且处理的几丁质酶活性始终高于对照。

番茄灰霉病菌在16 h内，随着Carvacrol作用时间的延长，几丁质酶活性逐渐升

高；在16 h后，酶活性降低。

**y=1.3383x+0.06161 R=0.999**

**0.8**

**0.7**

**0.6**

**0.5**

**OD-value**

**0.4**

**0.3**

**0.2**

**0.1**

**0.0** 0.1 0.2 0.3 0.4 0.5

**D-GlcNAc(mg/mL)**

**图3-12** **N-乙酰葡萄糖胺标准曲线Figure 3-12 standard curve of D-GlcNAc**

**1.2**

**1.0**

**Chitinase activity(mg/g)**

**0.8**

**0.6**

**0.4**

**0.2**

**1.5**

**1.4**

**1.3**

**Chitinase activity(mg/g)**

**1.2**

**1.1**

**1.0**

**0.9**

**0.8**

**CK**

**15Mg/L 30mg/L 60mg/L 90mg/L 120mg/L**

**CK**

**15mg/L**

**30mg/L 60mg/L 90mg/L 120mg/L**

**4h** 8h 16h 32h **64h Time(h)**

**4H** 8h 16h 32h **64h Time(h)**

**图3-13** **Carvacrol对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌几丁质酶活性的影响**

**Figure 3-13 Effect of the carvacrol on chitinase activity of** [***Magnaporthe oryzae***](http://www.baidu.com/link?url=DZBCWHnsRQ30w45frmEoxlJG6XmGwd6YVDWOjcS2DQVd-yfEqN0R2UM-HgPQhTvlpNSnd1HRHPL9jBZKosn_EaKH8aLxuuIb7AiQj_jYCJe) **and *Botrytis cinerea***

#### **3.3.4** **Carvacrol**对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌**N-**乙酰葡萄糖胺含量的影响

由图3-14可知，不同浓度的Carvacrol处理稻瘟病菌和番茄灰霉病菌菌丝后，N-乙酰葡萄糖胺含量随时间的延长先升高后下降。

稻瘟病菌菌丝经Carvacrol处理16 h后，菌丝中N-乙酰葡萄糖胺含量达到最大，之后呈下降趋势，而且浓度越大，N-乙酰葡萄糖胺含量越少，但高于对照。

番茄灰霉病菌经Carvacrol处理8 h后，番茄灰霉病菌菌丝N-乙酰葡萄糖胺含量达到最大，之后N-乙酰葡萄糖胺含量下降，16 h后N-乙酰葡萄糖胺含量低于对照。

**1.4**  **CK**

**1.5**

**CK**



**1.3**

**1.2**

**15Mg/L 30mg/L**

**1.4**

**3.125mg/L**

**6.25mg/L**

**1.1**  **60mg/L**

**1.3**  **12.5mg/L**

**1.0**

**D-GlcNAc(mg/g)**

**0.9**

**0.8**

**0.7**

**0.6**

**0.5**

**0.4**

**0.3**

**0.2**

**90Mg/L 120mg/L**

**4H** 8h 16h 32h 64h Time(h)

**1.2**

**1.1**

**D-GlcNAc(mg/g)**

**1.0**

**0.9**

**0.8**

**25Mg/L 50mg/L**

**4H** 8h 16h 32h 64h Time(h)

**图3-14** **Carvacrol对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌N-乙酰葡萄糖胺含量的影响**

**Figure 3-14 Effect of the carvacrol on D-GlcNAc content of** [***Magnaporthe oryzae***](http://www.baidu.com/link?url=DZBCWHnsRQ30w45frmEoxlJG6XmGwd6YVDWOjcS2DQVd-yfEqN0R2UM-HgPQhTvlpNSnd1HRHPL9jBZKosn_EaKH8aLxuuIb7AiQj_jYCJe) **and *Botrytis cinerea***

#### **3.3.5** **Carvacrol**对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌过氧化氢酶活性的影响

过氧化氢酶（CAT）是H2O2的解毒剂，它在生物的生理代谢过程中起着重要作用。Carvacrol对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌CAT活性的影响如图3-15, Carvacrol对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌CAT活性有明显的抑制作用，随着Carvacrol浓度的增加，酶活性呈下降趋势，且低于对照。64 h时，当Carvacrol浓度为分别为120 mg•L-1和50 mg•L-1时，酶活性最低。由于CAT活性的降低，菌体自身解毒能力会下降，因而会引起菌体的不良生长，导致菌体死亡。

**CK**

**10.5**  **15mg/L**

**10.0**  **30mg/L**



**7.5**

**CK**

**3.125mg/L**

**6.25mg/L**



**9.5** **60mg/L**

**7.0**

**12.5mg/L**

**9.0**

**8.5** **90mg/L**

**6.5**

**6.0**

**25Mg/L 50mg/L**

**8.0**

**7.5**

**7.0**

**6.5**

**U-value**

**6.0**

**5.5**

**5.0**

**4.5**

**4.0**

**3.5**

**3.0**

**2.5**

**2.0**

**1.5**

**120mg/L**

**4H** 8h 16h 32h 64h Time(h)

**5.5**

**5.0**

**4.5**

**4.0**

**U-value**

**3.5**

**3.0**

**2.5**

**2.0**

**1.5**

**1.0**

**0.5**

**0.0**

**4H** 8h 16h 32h 64h Time(h)

**图3-15** **Carvacrol对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌菌丝内CAT酶活性的影响**

**Figure 3-15 Effect of the carvacrol on activity units of CAT in** [***Magnaporthe oryzae***](http://www.baidu.com/link?url=DZBCWHnsRQ30w45frmEoxlJG6XmGwd6YVDWOjcS2DQVd-yfEqN0R2UM-HgPQhTvlpNSnd1HRHPL9jBZKosn_EaKH8aLxuuIb7AiQj_jYCJe) **and *Botrytis cinerea***

#### **3.3.6** **Carvacrol**对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌麦角甾醇含量的影响

由图3-17可知：不同浓度的Carvacrol处理稻瘟病菌和番茄灰霉病菌菌丝3d后，对麦角甾醇的含量具有明显的影响。

稻瘟病菌菌丝在无药剂处理的空白对照中，麦角甾醇的含量为0.60 mg•g-1，经系列浓度的Carvacrol处理3 d后，菌丝麦角甾醇含量明显降低；浓度为120 mg•L-1的Carvacrol处理后，菌丝麦角甾醇含量为0.06 mg•g-1，比对照降低了10倍。

番茄灰霉病菌菌丝经Carvacrol处理3 d后，低浓度促进麦角甾醇的生成，当浓度为12.5 mg•L-1时，含量达到最大为1.40 mg•g-1，之后含量呈下降趋势。

**y=22.95557x+4.53443 R=0.99992**

**2400**

**2200**

**2000**

**1800**

**1600**

**1400**

**1200**

**peak area**

**1000**

**800**

**600**

**400**

**200**

**0**

**-200**

**-10 0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110**

**the concentration of ergosterol(mg/L)**

**图3-16** **麦角甾醇标准曲线**

**Figure** **3-16** **standard curve of ergosterol**

**0.7**

**0.6**

**the content of ergosterol(mg/g)**

**0.5**

**0.4**

**0.3**

**1.6**

**1.4**

**the content of ergosterol(mg/g)**

**1.2**

**1.0**

**0.8**

**0.2** **0.6**

**0.1** **0.4**

**0.0**

**0** 30 60 90 **120**

**The concentration of carvacrol(mg/L)**

**0.2**

**0** 10 20 30 40 50

**The concentration of carvacrol(mg/L)**

**图3-17** **Carvacrol对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌麦角甾醇含量的影响**

**Figure 3-17 Effect of the carvacrol on ergosterol content of** [***Magnaporthe oryzae***](http://www.baidu.com/link?url=DZBCWHnsRQ30w45frmEoxlJG6XmGwd6YVDWOjcS2DQVd-yfEqN0R2UM-HgPQhTvlpNSnd1HRHPL9jBZKosn_EaKH8aLxuuIb7AiQj_jYCJe) **and *Botrytis cinerea***

## **4** 讨论

### **4.1** 关于**Carvacrol**对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌抑菌活性的思考

通过生长速率法和孢子萌发法，研究了Carvacrol对属于半知菌亚门的稻瘟病菌和番茄灰霉病菌菌丝生长发育及孢子萌发的影响，结果表明：Carvacrol对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌菌丝的生长发育具有较强的抑制作用。

（1）对于稻瘟病菌，当处理浓度为90 mg•L-1、处理7 d时，Carvacrol对稻瘟病菌菌丝生长抑制率可达89.16%，与李丽娜[[98]](#_bookmark146)等研究的苦参、牛膝菊、独角莲、曼陀罗4种植物（浓度为100 mg•mL-1）对稻瘟病菌菌丝生长的抑制率低于65%，及与其它多种植物提取物的抑菌活性相比较，Carvacrol表现出更高的抑菌活性。

对于番茄灰霉病菌，当处理浓度为25 mg•L-1、处理7 d时，Carvacrol对番茄灰霉病菌菌丝生长抑制率可达87.97%，与张新虎等[[33]](#_bookmark86)研究的苍耳提取物（浓度为30 mg•mL-1）对番茄灰霉病菌菌丝生长抑制率78.1%，与李玉平等[[44]](#_bookmark95)研究的大花金挖耳、猪毛蒿、臭蒿等几种菊科植物（浓度为100 mg•mL-1）对番茄灰霉病菌菌丝生长的抑制率70%，及与其它多种植物提取物的抑菌活性相比较，Carvacrol表现出更高的抑菌活性，因此在开发新型植物源杀菌剂方面，Carvacrol具有更大的潜力和优势。

（2）稻瘟病菌以菌丝和分生孢子在病稻草、病谷上越冬；番茄灰霉病菌以菌核在土壤中或以菌丝块及分生孢子随病残体在土壤中越冬，成为第二年的初侵染源。以此推测Carvacrol可以从侵染源头抑制稻瘟病害和番茄灰霉病害的发生。且Carvacrol易挥发，为其采用大棚熏蒸的方式防治病害提供了可能性。

（3）试验中仅测定了Carvacrol对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌的离体抑制效果，就杀菌剂而言，离体试验和活体试验的相关性有时较差，所以在今后的试验中还应对其进行活体生物试验测定。

### **4.2** 关于**Carvacrol**处理稻瘟病菌和番茄灰霉病菌菌丝形态观察的思考

由于采用菌丝生长速率法仅仅在平板上显现出Carvacrol对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌的粗略影响，因而采取进一步光学显微镜和电镜实验观察。

由光镜和电镜的观察结果可知，Carvacrol作用于稻瘟病菌和番茄灰霉病菌菌丝的细胞壁和细胞膜，与前面试验结合更好的说明了Carvacrol对两种菌的抑制作用，并且为推测探明Carvacrol对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌作用机制及作用位点等提供依据。

### **4.3** 关于**Carvacrol**对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌生理生化测定的思考

本文通过相应方法，对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌的细胞膜通透性、可溶性蛋白含量、几丁质酶活性、N-乙酰葡萄糖胺、麦角甾醇含量以及过氧化氢酶活性进行了测定。

（1）细胞膜上含有蛋白质和磷脂，麦角甾醇也是丝状真菌细胞膜的重要成分之一，如果这些成分的合成受阻，膜的结构和功能就要受到损害，造成原生质渗漏，最后导致菌体细胞的死亡[[99]](#_bookmark147)。显微观察表明Carvacrol可导致原生质外渗，电导率测定结果进一步说明Carvacrol 能够增大稻瘟病菌和番茄灰霉病菌细胞膜的渗透性，

Carvacrol处理后麦角甾醇含量下降，更说明两种菌细胞膜上存在着Carvacrol的作用位点。

（2）细胞壁是菌体细胞的最外层结构，它在维持菌体细胞形态和细胞内高渗状态起着极为重要的作用。扫描电镜观察到两种菌在CV的作用下菌丝大量断裂。稻瘟病菌和番茄灰霉病菌属于半知菌亚门，其细胞壁中主要成分是几丁质，本文通过对细胞壁几丁质合成所需底物N-乙酰葡萄糖胺含量测定表明，经Carvacrol处理后，胞内N-乙酰葡萄糖胺含量高于对照，细胞壁相关水解酶测定结果表明几丁质酶活性高于对照，并且起初其含量随着时间的延长而增加，可能是由于几丁质酶活性升高造成细胞壁合成几丁质前提水解，引起N-乙酰葡萄糖胺含量升高，N-乙酰葡萄糖胺在参与细胞壁形成过程中受阻。之后N-乙酰葡萄糖胺含量下降，可能是由于被水解成葡萄糖，以补偿细胞中还原糖的不足来维持生存；而几丁质酶活性也开始降低，可能是由于细胞膜通透性改变后引起膜上的几丁质酶活性降低。

对作用机制的研究只是初步探讨，还有待于从分子角度进行研究，确定Carvacrol

的分子作用靶标。

## **5** 结论

本论文研究了Carvacrol对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌的抑制作用，并初步探讨了

Carvacrol对两种菌的作用机制，初步结论如下：

（1）Carvacrol较其他植物源杀菌剂对稻瘟病菌和番茄灰霉病菌菌丝生长发育表现出较强的抑制作用，但对两种菌孢子萌发没有影响。

（2）光镜和电镜观察表明，Carvacrol处理的稻瘟病菌和番茄灰霉病菌菌丝形态结构异常。低浓度表现为菌丝扭曲、菌丝粗细不均、内含物固缩、出现液泡、菌丝局部和顶端膨大；高浓度表现为菌丝分支增多、菌丝细胞空腔、菌体细胞壁模糊不清、

菌丝断裂。

（3）稻瘟病菌和番茄灰霉病菌经Carvacrol处理后，菌丝细胞膜透性增加、麦角甾醇含量下降，表明细胞膜结构损坏，使内含物流出，导致菌丝出现干瘪、出现液泡、菌丝细胞质壁分离甚至空腔的现象。

（4）稻瘟病菌和番茄灰霉病菌经Carvacrol处理后，蛋白质合成受阻，菌丝体可溶性蛋白含量下降，对菌丝生长产生抑制作用。

（5）稻瘟病菌和番茄灰霉病菌经Carvacrol处理后，几丁质酶活性的升高，使菌体细胞壁几丁质加速分解，N-乙酰葡萄糖胺含量升高，导致菌体细胞壁结构破坏，菌丝出现断裂、菌体细胞壁模糊不清的现象。

（6）稻瘟病菌和番茄灰霉病菌经Carvacrol处理后，过氧化氢酶活性下降，使稻瘟病菌和番茄灰霉病菌解毒作用降低，导致菌体死亡。

## **6** 创新点

（1）本文首次研究了Carvacrol对半知菌亚门的稻瘟病菌和番茄灰霉病菌的抑菌活性及抑菌机制，为其将来开发成农业杀菌剂提供理论依据。

（2）本文首次运用高效液相色谱法测定细胞膜最重要的构成成分之一麦角甾醇的含量变化入手，更直观的说明细胞膜组成结构发生变化，导致菌体死亡；

（3）初步揭示了Carvacrol 抑制稻瘟病菌和番茄灰霉病菌生长的作用机制：

Carvacrol通过抑制蛋白质的合成，使菌丝生长受到抑制；CAT活性的降低，菌体自身解毒能力下降，引起菌体的不良生长；麦角甾醇和几丁质的合成受阻，使菌体细胞膜和细胞壁结构破坏，内含物流出，菌体死亡。

参考文献

[1] Ou S. H.. Rice diseases[M]. IRRI,1985.

[2]梁海英，陶科，张新刚等.瑞香狼毒对稻瘟病菌的抑制活性及其机理的初步研究[J].四川大学学报

（自然科学版）,2008,45(2): 446-450.

[3]陈善铭， 齐兆生.中国农作物病虫害[M].中国农业出版社,1996。

[4]裘维蕃， 仇元，王守正.农业植物病理学[M].农业出版社,1991。

[5]董金皋.农业植物病理学[M].中国农业出版社，2007.  [6] 李杨，王耀雯，王育荣等.水稻稻瘟病菌研究进展[J].广西农业科学, 2010. 41(008):789-792.

[7]何明，顾正远.水稻主要病虫害综合防治技术体系的新发展[J].见:中国植物保护研究进展北京：中国科学技术出版杜, 1996: 73-77.

[8]蒋晓英，张致力，陈旭等.稻瘟病无害化防控技术研究进展[J].江西农业学报，2009, 21(3)：121-123.

[9]温小红，谢明杰，姜健等.水稻稻瘟病防治方法研究进展[J].中国农学通报, 2013, 29(3)：190-195.

[10]王家品，冯雪松，江健.杂糯间栽技术控制稻瘟病试验[J].安徽农业科学，2008, 36(26)：11428-11430.

[11] Gaikwad A. P., C. A. Nimbalkar. Phytotoxicity of copper fungicides to guava fruits[J]. Journal of environmental biology/Academy of Environmental Biology, India, 2005,26(1):155.

[12]陈彦， 赵彤华，王兴亚等.52.5%丙环唑・三环唑悬浮剂防治水稻稻瘟病和纹枯病药效评价[J].辽

宁农业科学, 2012, (1): 69-71.

[13] 李忠有.水稻稻瘟病的防治[J].农村科学实验, 2009, (6):15-15.

[14]李永刚，宋兴舜，马凤鸣等.水稻稻瘟病拮抗菌L1鉴定及抑菌特性的初步研究[J].微生物学通报, 2008, 35(6)：898-902.

[15] Amadioha AC.. Controlling rice blast in vitro and in vivo with extracts of Azadirachta indica[J].

*Crop Protection*, 2000,19(5): 287-290.

[16] Rajappan K., Ushamlini C., Subramanian N., et al. Management of grain discoloration of rice with solvent-free EC formulations of neem and pungam oils[J]. *Phytoparasitica*, 2001,29(2):171-174.

[17]骆焱平，郑服丛，杨叶.128种南药植物提取物对6种病原菌的生长抑制作用[J].热带作物学报，

2004,25(4):106-111.

[18]张应烙，冯俊涛，王汝贤等.孜然提取物对几种病菌生物活性的初步研究[J].西北农林科技大学学报（自然科学版）, 2003, 31(5)：77-79.

[19]霍光华，詹五根，付日辉等.木荷及其与无患子皂甙抽提物单复配体外抗稻瘟病活性[J].天然产物研究与开发，2010, 22(005)：755-760.

[20] Lee Sung-Eun, Park Byeoung-Soo, Kim Moo-Key, et al.. Fungicidal activity of pipernonaline, a piperidine alkaloid derived from long pepper, *Piper longum* L., against phytopathogenic fungi[J].

Crop Protection, 2001, 20(6): 523-528.

[21]胡新文，郭建春，郑学勤.抗真菌蛋白Rs-AFPs物学特性的研究[J].热带作物学报, 1998, 19(2):36-42.

[22]徐明，李海涛，张子君等.番茄灰霉病病原菌生物学特性的研究[J].贵州农业科学，

2009,37(3):68-71.

[23]王玉堂.棚室番茄灰霉病的发生与防治[J].农业工程技术（温室园艺）, 2006, 12: 020。

[24]常法平，张雪江，石振飞.日光温室番茄几种主要病害的综合防治[J].农业工程技术（温室园艺）, 2006, 12: 018。

[25]朱建兰.番茄灰霉病菌的生物学特性研究[J].甘肃农业大学学报，1995, 30(1)：73-78.

[26]马辉刚，李瑞明.番茄灰霉病菌生物学特性研究[J].江西农业大学学报, 1998, 20(2)：207-209.

[27] Guimaraes R. L., R. T. Chetelat, H. U. Stotz. Resistance to *Botrytis cinerea* in Solanum lycopersicoides is dominant in hybrids with tomato and involves induced hyphal death[J]. European journal of plant pathology, 2004,110(1):13-23.

[28]祝明亮，严金平，孙启玲等..植物病原真菌对二甲酰亚胺类杀菌剂的抗性分子机制[J].生物技术，

2005,15(5):95-97.

[29]张兴，陈安良，冯俊涛.新型杀菌剂丙烷脒开发研究[J].中国农资，2005，(9)：57-58.

[30]张智，李君明，宋燕等.番茄灰霉病及其防治研究进展[J].内蒙古农业大学学报（自然科学版）, 2005, 2: 031。

[31]刘春阳.棚室蔬菜灰霉病的发生特点与防治[J].吉林农业，2012，(3)：79-79.

[32]汪金莲，邱业先，扶教龙等.茶多酚对稻瘟病菌的抑制作用及抑菌机理[J].天然产物研究与开发，2011, 23: 918-922.

[33]张新虎，何静，沈慧敏.苍耳提取物对番茄灰霉病菌的抑制作用及抑菌机理初探[J].草业学报，

2008,17(3):99-104.

[34]王春梅，张杰，陈浩等.丁香酚对灰霉病菌的抑制活性及对菌丝形态的影响[J].江西农业学报，2008, 20(10)：72-75.

[35]侯玉霞，龚玉酶，李春林等.来源于植物的短肽LD-1对番茄灰霉病的抑制作用及其抗病性研究

[J].植物保护, 2008,34(5):75-79.

[36] Romanazzi Gianfranco, Karabulut Ozgur, Smilanick Joseph L.. Combination of chitosan and ethanol to control postharvest gray mold of table grapes[J]. Postharvest biology and technology, 2007,45(1):134-140.

[37]王树桐，曹克强，张凤巧..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)(ZK):91-94.

[38]王兴全，张新虎，杨顺义等.苍耳提取物对番茄灰霉病菌抑制机理的研究[J].甘肃农业大学学报，2008, 43(3)：107-110.

[39]耿建峰.洋葱油和大蒜提取物对灰霉菌的作用效果[J].中国蔬菜，2008，(5)：20-22.

[40]王桂清.辽细辛提取物对灰葡萄孢菌的抑制效果[J].植物保护，2008, 34(2)：53-57.

[41]操海群，岳永德，花日茂等.植物源农药研究进展（综述）[J].安徽农业大学学报，2000, 27(1)：40-44.

[42]吴轶青.使用天然抗菌化合物保护作物[J].世界农药，1996, 18(3)：9-12.

[43]陈娇，代光辉，顾振芳等.58种植物提取液对葡萄霜霉病菌的抑菌活性筛选研究[J].天然产物研究与开发，2002, 14(5)：9-13.

[44]李玉平，冯俊涛，邵红军等.25种菊科植物提取物对3种植物病原菌的药效试验[J].西北农林科技大学学报（自然科学版）, 2003, 31(4)：123-126.

[45]赵纯森，黄俊斌.厚朴叶中抑菌活性成分鉴别及其防病效果[J].华中农业大学学报，1994, 13(4)：373-377.

[46]方德秋，肖顺元.柠檬醛及香精油的抗菌研究概述[J].天然产物研究与开发，1994, 6(2)：75-78.

[47] Cole M. D., Bridge Paul D, Dellar Joanne E. et al.. Antifungal activity of *Neo-clerodane* diterpenoids from *Scutellaria*[J]. Phytochemistry, 1991, 30(4): 1125-1127.

[48]陈征宇，朱友平.植物体内的抗真菌成分[J].国外医药（植物药分册）,1993, 8(3)：3-8

[49]郁建平，刘兴宽，古练权等.贵州金丝桃挥发油成分及抗菌活性研究[J].中国药学杂志, 2002, 37(12)：900-902.

[50] Harborne J. B.. Introduction to ecological biochemistry[M]. Access Online via Elsevier, 1993.

[51] Grayer R. J., J. B. Harborne. A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982–1993[J]. Phytochemistry, 1994, 37(1): 19-42.

[52] Wippich C., M. Wink. Biological properties of alkaloids. Influence of quinolizidine alkaloids and gramine on the germination and development of powdery mildew, *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*[J]. Experientia, 1985, 41(11): 1477-1479.

[53] Lambert RJW, Skandamis Proteus, Coote Proteus 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.

[54] Tomas-Barberán F. A., J. D. Msonthi, K. Hostettmann. Antifungal epicuticular methylated flavonoids from *Helichrysum nitens*[J]. Phytochemistry, 1988, 27(3): 753-755.

[55] Cooksey C. J., Garratt Peter J, Richards Susan E. et al.. A dienyl stilbene phytoalexin from *Arachis hypogaea*[J]. Phytochemistry, 1988, 27(4): 1015-1016.

[56] Adesanya SA., Ogundana SK., Roberts MF.. Dihydrostilbene phytoalexins from *Dioscorea bulbifera* and *D. dumentorum*[J]. Phytochemistry, 1989, 28(3): 773-774.

[57] Huang, Zhengyu, White D. G., Payne G. A.. Corn seed proteins inhibitory to Aspergillus flavus and aflatoxin biosynthesis[J]. Phytopathology, 1997, 87(6): 622-627.

[58]周立.小麦多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白对几种病原真菌抑制作用的研究[J].植物病理学报，1998,28(2)：107-112.

[59]石志琦，沈寿国，徐朗莱等.蛇床子素对植物病原真菌抑制机制的初步研究[J].农药学学报, 2004, 6(4)：28-32.

[60]沈寿国.蛇床子素抑制植物病原真菌机制的初步研究[D].南京农业大学,2004。

[61] Nguefack J., B. B. Budde, M. Jakobsen. Five essential oils from aromatic plants of Cameroon: their antibacterial activity and ability to permeabilize the cytoplasmic membrane of Listeria innocua examined by flow cytometry[J]. Letters in applied microbiology, 2004, 39(5): 395-400.

[62] Khambay B. P. S., Batty Duncan, Jewess Philip J. et al.. Mode of action and pesticidal activity of the natural product dunnione and of some analogues[J]. Pest management science, 2003, 59(2):

174-182.

[63]赵善欢.植物化学保护[M].中国农业出版社,2000。

[64]王莹.茶多酚的抗氧化和抑菌活性及其增效剂[J].生物学杂志，2007, 24(5)：54-56.

[65] Karavaev VA., Solntsev MK, Yurina TP. et al.. Antifungal activity of aqueous extracts of the leaves of cowparsnip and comfrey[J]. Biology Bulletin of the Russian Academy of Sciences, 2001, 28(4): 365-370.

[66]刘学端，肖启明.植物源农药防治烟草花叶病机理初探[J].中国生物防治,1997, 13(3)：128-131.

[67] Can Baser K. H.. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils[J]. Current pharmaceutical design, 2008, 14(29): 3106-3119.

[68] Aligiannis N., Kalpoutzakis E., Mitaku Sofia. et al.. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two Origanum species[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2001, 49(9): 4168-4170.

[69] Sökmen M., Se rkedjieva Julia, Daferera Dimitra. et al.. In vitro antioxidant, antimicrobial, and antiviral activities of the essential oil and various extracts from herbal parts and callus cultures of Origanum acutidens[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2004, 52(11): 3309-3312.

[70] He, L., Mo Huanbiao, Hadisusilo Susiowati et al.. Isoprenoids suppress the growth of murine B16 melanomas in vitro and in vivo[J]. The Journal of nutrition, 1997, 127(5): 668-674.

[71] Koparal A. T., M. Zeytinoglu. Effects of carvacrol on a human non-small cell lung cancer (NSCLC) cell line, A549[J]. Cytotechnology, 2003, 43(1-3): 149-154.

[72] Karkabounas S., Kostoula OK., Daskalou T. et al.. Anticarcinogenic and antiplatelet effects of carvacrol[J]. Exp Oncol, 2006, 28(2): 121-5.

[73] Horvathova, E., V. Turcaniova, and D. Slamenova. Comparative study of DNA-damaging and DNA-protective effects of selected components of essential plant oils in human leukemic cells K562[J]. Neoplasma, 2007, 54(6): 478.

[74] Arunasree, KM.. Anti-proliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB 231[J]. Phytomedicine, 2010. 17(8): 581-588.

[75]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.

[76]王玲，谌晓洪. Carvacrol对粘虫的毒杀活性研究[J].安徽农业科学, 2010, (016): 8488-8490.

[77]王新伟，刘欢，魏静等.牛至油, Carvacrol, 柠檬醛和肉桂醛抑菌作用研究[J].食品工业, 2010, (5): 13-16.

[78]王晓君，蒋琳琳，程天印.百里香酚和Carvacrol对细菌形态结构的影响[J].畜牧兽医杂志, 2012，

31(3):10-11.

[79] Ultee A., Kets Edwin PW, Alberda Mark. et al.. Adaptation of the food-borne pathogen Bacillus cereus to carvacrol[J]. Archives of microbiology, 2000,174(4): 233-238.

[80] Ultee, A., Slump RA, Steging G. et al.. Antimicrobial activity of carvacrol toward Bacillus cereus on rice[J]. Journal of Food Protection, 2000, 63(5): 620-624.

[81] Jin-lian, W., Ye-xian QIU, Hong-wei CHEN. et al.. Inhibitive Action of Tea-polyphenol on Some Plant Pathogenic Fungi[J]. Natural Product Research & Development, 2008, 20(4).

[82]杨小林，张舒，吕亮等.基于中国鉴别品种及单基因品系的湖北省稻瘟病菌的致病型分布[J].湖

北农业科学, 2010,49(011): 2779-2781.

[83]陈年春.农药生物测定技术[M].北京农业大学出版社, 1991。

[84] Meir S., Droby Samir, Davidson Herman. et al.. Suppression of Botrytis rot in cut rose flowers by postharvest application of methyl jasmonate[J]. Postharvest biology and technology, 1998, 13(3):235-243.

[85]康振生.植物病原真菌的超微结构[M].北京： 中国科学技术出版, 1996。

[86] Lee, H. J., G. J. Choi, and K. Y. Cho. Correlation of Lipid Peroxidation in *Botrytis cinerea* Caused by Dicarboximide Fungicides with Their Fungicidal Activity[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 1998, 46(2):737-741.

[87] Hamm, P. B., T. F. Cummings, and D. A. Johnson. Comparison of deposition patterns in two programs for applying protectant fungicides to potato stems and leaves for the control of late blight (Phytophthora infestans)[J]. American journal of potato research, 2006, 83(6): 473-484.

[88]高向阳.新抗生素万隆霉素对黄瓜疫病菌的作用机理研究[D].广州：华南理工大学,2005。

[89]毓荃.生物化学研究技术[M].农业出版社,1995。

[90]李合生.植物生理生化实验原理与技术（面向21世纪课程教材）[M].北京：高等教育出版社,2000。

[91]荆二勇. BIT 对灰霉菌抑菌活性及抑菌机制的初步研究[D].西北大学,2008。

[92] Zhu, C. and Z. Ding. Expression and function analysis of mycobacteriophage D29 chitinase gene[J]. Sheng wu hua xue yu sheng wu wu li jin zhan, 2004. 32(8): 753-757.

[93] Li, Y. -z., Zheng Xiao-hua, Tang Hai-lin. et al.. Increase ofß-1, 3-glucanase and chitinase activities in cotton callus cells treated by salicylic acid and toxin of Verticillium dahliae[J]. Botanical Society of China and Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences,2003.

[94]顾向阳，胡正嘉.一种测定土壤几丁质酶活性的方法[J].土壤通报，1994, 25(06)：284-285.

[95] 钱嘉渊，酶的测定方法[M].北京： 中国轻工出版社, 1992. 1: 992.276-278.

[96]吴学宏，肖建华，张文华等.2%三唑醇・戊唑醇种衣剂对小麦纹枯病菌麦角甾醇含量的影响[J]. 农药学学报, 2006, 7(4)：372-375.

[97]韩平，刘西莉，刘鹏飞等.高效液相色谱法研究啶菌噁唑对番茄灰霉病菌麦角甾醇生物合成的影响[J].分析化学, 2006, 34(10)：1467-1470.

[98] 李丽娜, 纪明ft, 李艳丽等. 4种植物提取物对植物病原菌的抑菌作用[J].农药, 2006, 45(1): 61-63.

[99]徐铮，曹永兵.麦角甾醇生物合成途径中的抗真菌药作用靶酶[J].国外医药：抗生素分册，

2001,22(5): 193-197.

致谢

岁月如歌，光阴似箭，三年的研究生生活即将结束。回首过往，对于那些帮助过、指导过、激励过我的人，心中充满了感激。

首先要感谢我的导师叶敏研究员！叶老师广博的学识、深厚的学术素养、严谨求实的治学精神，以及对科学前沿的敏锐而准确的把握，激励着我在以后的学术与人生道路上不断进取；叶老师诚挚谦虚的品格和宽厚善良的处事方式，永远值得我学习和效仿。

在叶老师的指导和帮助下，培养了我独立思考和分析、解决问题的能力，令我获益良多。

本课题在实验过程中得到了实验室范黎明助理研究员、苏发武博士、查有贵老师的无私帮助，使论文可以顺利完成。在此向他们致以最诚挚的感谢。

感谢蔡婷婷师姐、徐帅帅同学、阳唐云同学、姜姗姗师妹、王凯博师弟、陈元梅师妹、陶丽红师妹，在此向他们表示感谢。

此外，还要感谢魏朝霞师姐、毛新宇师兄、廖静静师姐、赵芝同学。

我还要特别感谢我的父母，他们给与了我无限关爱和支持！“谁言寸草心，报得三春晖”，愿我的亲人永远健康幸福！

最后，向参加我论文评阅、评议和答辩委员会的各位老师致以衷心的感谢！