

# 桔萆酸药效分析及对辣椒疫霉病菌的抑制

张娟

(咸阳职业技术学院, 陕西 西咸新区 712046)

**摘要:** 为探究植物性提取物桔萆酸活体对辣椒疫霉病菌、番茄灰霉病菌、黄瓜白粉病菌和小麦白粉病菌的生物性抑制作用, 以及对辣椒疫霉病菌的药效, 选取了常规农药药剂速克灵、甲霜灵和三唑酮进行对比实验, 采用组织法和盆栽药效实验。结果表明, 桔萆酸对辣椒疫霉病菌、番茄灰霉病菌和黄瓜白粉病菌具有良好的生物活性抑制作用, 对接种的辣椒疫霉病菌果实无明显效果防治和治疗效果。通过光学显微镜和电子显微镜观察表明, 桔萆酸对辣椒疫霉病菌生物活性及形态具有较大的影响。同时能有效改变辣椒疫霉病菌细胞膜通透性, 且桔萆酸浓度越高, 短时间内改变效果越明显, 最终趋于稳定。

**关键词:** 桔萆酸; 药效分析; 抑菌作用; 辣椒疫霉病菌

**中图分类号:** TQ 455

**文献标识码:** A

**文章编号:** 94047-(2020)01-031-05

植物次生代谢产物较多, 其中代谢的部分生物活性化合物具有一定的杀虫及杀菌作用, 通过多年以来的研究, 将此类生物活性化合物进行提取合成, 已被当作植物性农药来利用。随着化学合成技术的不断提高, 每年都有类似植物性化学合成抗菌药物研制成果诞生, 天然植物性抗菌化合物种类及数量不断增多。但总体来看, 能够大规模应用于农作物种植及病虫害防治上的仍然较少, 研究成果的实际应用性仍然需要进一步加深。

目前研究成果侧重于对植物提取生物性化合物的合成以及对细菌的抑制、对病毒毒株钝化效果等方面。例如胡林峰等(2008)利用离体于活体相结合的方法, 通过实验分析了桔萆醛和桔萆酸对各类农作物病菌的抑菌活性<sup>[1]</sup>; 高艳清等(2011)利用碱性高锰酸钾作为氧化剂合成了诺蒽酸, 再通过酸性脱水过程并重排开环合成了二氢桔萆酸, 最后与各类醇反应生成了7种酯衍生物<sup>[2]</sup>; 熊李波等(2018)利用水蒸馏法提取出了从孜然、花椒和芥子精油, 并分析了提取物的化学成分, 通过实验对3种提取物进行不同比例混合, 测定对真菌的抑制效果, 选择了最佳合成比例<sup>[3]</sup>; 高艳清等(2012)利用抑菌环法分析了二氢桔萆酸对大肠杆菌的抑制

作用及抑制效果<sup>[4]</sup>; 胡林峰等(2007)分析了桔萆酸和桔萆醛对油菜菌核病菌和辣椒疫霉的抑制效果<sup>[5]</sup>; 冯俊涛等(2012)提取了孜然种子中的桔萆酸, 通过室内盆栽和滴定方法, 分析了对辣椒疫霉病菌的抑制作用<sup>[6]</sup>。

孜然种子作为烧烤食品重要的调味品被人们广泛喜爱, 其提取物具有杀菌、杀虫和抗氧化等生物活性<sup>[7]</sup>。提取物中的桔萆酸和桔萆醛能对小麦根枯病菌、油菜菌核病菌和辣椒疫霉病菌产生较好的抑制作用, 其中桔萆酸的效果更好<sup>[8-10]</sup>。针对桔萆酸具有较好的抑菌作用, 通过桔萆酸于其他病害药品进行药效分析对比, 更进一步明确桔萆酸的抑菌效果, 并详细的研究了桔萆酸对辣椒疫霉病菌抑菌作用方式及机理, 为桔萆酸作为生物活性杀菌剂的推广应用提供理论指导。

## 1 桔萆酸药效分析

### 1.1 实验材料

1.1.1 实验药品 从孜然种子种提取的桔萆酸, 纯度93%; 50%速克灵可湿性粉剂, 厂家为日本住友化学株式会社; 20%精品三唑酮, 厂家为北美农大集团; 25%甲霜灵可湿性粉剂, 厂家为湖北远成赛创

**收稿日期:** 2019-11-12

**基金项目:** 陕西省教育厅项目“淀粉改性乙烯基与铝配合物鞣剂的合成及应用研究”(19JK0933); “桔萆酸对四种病害的药效及其对辣椒疫霉病菌生长的影响研究”(2017KYC03)

**作者简介:** 张娟(1981—), 女, 陕西咸阳人, 讲师, 硕士, 研究方向: 从事生物化工方向教学科研工作。

科技有限公司,均为市场农药店购买。

1.1.2 实验植物供体 辣椒(线辣椒),黄瓜(农城8号),小麦(西农979),番茄(郑粉四号),市场购买。

1.1.3 实验设备 室内实验台, DWRH-300生化培养箱, TOLEDO/梅特勒-托利多电子天平, JSM-IT500HR 扫描电子显微镜, JEM-2000FX分析型透射电子显微镜, thermo multiskan fc 酶标仪, 冰箱(5℃, -20℃, -70℃), SJJA-18N-50A低温冷冻干燥机, TG20G高速离心机, DDS-307型电导率仪等(图1)。



图1 实验环境

Fig.1 Experimental environment

## 1.2 药效测定方法

1.2.1 组织法 利用组织法测定药剂对植物供体的药效时,先取新鲜健康形状大小接近带蒂的果实,用95%酒精就是浸泡、擦洗消毒,晾干后备用。施药过程向果实表面进行全覆盖式喷洒,接种时用针轻轻划破果实表面将病菌接种,每个果实接种在三个不同位置。等发病后测量果实上病斑直径,药效为(对照组病斑直径-释药组病斑直径)除以对照组病斑直径。

对照组为喷洒清水,药剂对照组为甲霜灵和速克灵。接种过程为分析药剂的保护及治疗作用,喷洒药剂后24小时后接种为分析药剂保护作用,接种48小时后喷洒为分析药剂治疗作用。培养环境温度25~30℃、枯茗酸药剂浓度均为0.5和1g/L两组。

1.2.2 盆栽药效实验 培育植物供体幼苗,待其成株后移植营养钵中,为避免植株之间的相互影响,每盆内培养4株。制备辣椒疫霉病菌浓度为8000个/毫升的病菌培养液、小麦白粉病菌浓度为3000个/毫升的病菌培养液、黄瓜白粉病菌浓度为4000个/毫升的病菌培养液。利用孢子抖落法接种病源菌,接种后放置于人工气候箱中培养,设置度昼25℃、夜20℃,相对湿度位65%。

枯茗酸药剂浓度均为0.5和1g/L两组,设置清水对照组,药剂对照组甲霜灵和三唑酮。喷洒药剂后24小时后接种为分析药剂保护作用,接种72小时后喷洒为分析药剂治疗作用。药效分析方法参考杨婷等(2017)、徐丹等(2018)为(对照组病情-释药组病情)除以对照组病情<sup>[11-12]</sup>。

1.2.3 形态及超微结构观察方法 利用光学显微镜将培养4天左右的病菌放置于载玻片上放大400倍进行观察。

扫描电镜观察过程首先需要将病菌样品利用磷酸缓冲液进行冲洗,然后通过丙酮脱水、纯醋酸异戊酯置换,干燥、粘样、镀膜后再进行观察分析。

透射电镜固定采用戊二醛-锇酸双重固定法,固定后通过丙酮脱水,包埋剂渗透、包埋后在25℃温度下聚合2小时,之后用刀片切成薄片,然后利用醋酸双氧铀柠檬酸铅染色后进行观察分析。

1.2.4 细胞膜通透性测定 分析枯茗酸对辣椒疫霉病菌细胞膜透性造成的影响,利用DDS-307型电导率仪测的空白组(蒸馏水+菌线)、对照组(溶剂+菌丝)、枯茗酸(0.01g/L、0.04g/L、0.1g/L三组不同浓度),分别测定在0、0.5h、1h、2h、3h、5h、10h、20h、30h、40h、50h时间后的电导率,分析电导率于时间的关系。

## 1.3 实验结果及分析

1.3.1 组织法测定结果 测定结果反应出枯茗酸对辣椒疫霉病菌侵染辣椒果实几乎无明显治疗效果,对番茄灰霉病具有一定的效果,测定结果见表1所示。

表1 组织法测定枯茗酸对番茄灰霉病效果

Table 1 Effect of cumin on Botrytis cinerea by tissue method

样品	浓度/ (g·L <sup>-1</sup> )	保护分析		治疗分析	
		病斑直径/mm	药效/%	病斑直径/mm	药效/%
清水	/	29.56 ± 0.25	/	30.22 ± 0.45	/
溶剂	0.01	28.12 ± 0.51	/	29.25 ± 0.12	/
枯茗酸	0.5	19.25 ± 0.26	46.08	23.56 ± 0.25	19.45
	1	14.58 ± 0.46	48.15	19.51 ± 0.36	33.30
速克灵	0.2	8.25 ± 0.86	70.67	9.25 ± 0.21	68.38

1.3.2 盆栽药效测定结果 盆栽实验结果反应出了枯茗酸对辣椒苗期疫病、黄瓜白粉病具有一定的保护和治疗效果,测定结果见表2所示。

## 2 枯茗酸对辣椒疫霉病菌的抑制

表2 盆栽法测定枯茗酸对三种病害效果  
Table 2 Pot experiment on the effect of cumin acid on three diseases

病菌	样品	浓度/ ( $g \cdot L^{-1}$ )	保护分析		治疗分析	
			病情 指数	药效/%	病情 指数	药效/%
辣椒疫 霉病	清水	/	93.55	/	89.25	/
	溶剂	0.01	93.12	/	90.36	/
	枯茗酸	0.5	56.36	39.48	51.16	43.38
		1	35.21	62.19	36.54	59.56
	甲霜灵	0.1	29.24	68.60	33.42	63.01
小麦 白粉病	清水	/	97.51	/	96.58	/
	溶剂	0.01	96.25	/	94.19	/
	枯茗酸	0.5	39.78	58.67	41.69	55.74
		1	29.24	69.62	31.52	66.54
	三唑酮	0.1	11.54	88.01	28.58	69.66
黄瓜 白粉病	清水	/	85.65	/	83.11	/
	溶剂	0.01	84.91	/	82.28	/
	枯茗酸	0.5	48.65	42.70	49.86	39.40
		1	31.27	63.17	41.63	49.40
	三唑酮	0.1	18.93	77.71	26.87	67.34

## 2.1 对辣椒疫霉菌菌丝形态结构影响

2.1.1 病菌菌丝形态观察 利用光学显微镜观察表明,空白对照组实验即未经过枯茗酸处理的培养液中辣椒疫霉菌菌丝纤细,未正常细菌形态特征。通过枯茗酸处理后培养液中辣椒疫霉菌菌丝出现了大量的分枝,病呈现出膨大的特征。

扫描电子显微镜观察表明,未经过枯茗酸处理病菌菌丝纤细光滑,菌丝粗细较为均匀,伸展情况良好,延伸生长点呈现尖锥状态(图1)。0.5g/L枯茗酸处理后观察发现病菌菌丝表面粗糙、分枝增多,菌丝粗细变化较大。1g/L枯茗酸处理后观察发现病菌菌丝表面异常,出现异常膨大,分枝分布杂乱且显著增多(图2)。观察结果与光学显微镜基本一致。

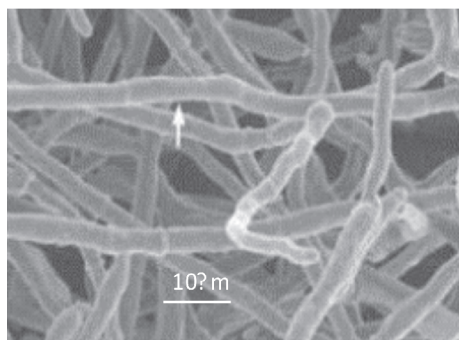


图2 未经枯茗酸处理辣椒疫霉菌菌丝扫描电镜照片

Fig.1 Scanning electron micrograph of

Phytophthora capsici mycelium without cumin treatment

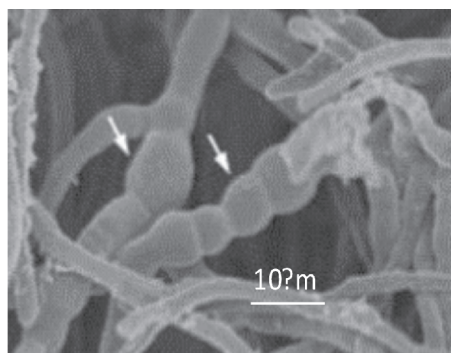


图3 1g/L浓度枯茗酸处理后辣椒疫霉菌菌丝扫描电镜照片

Fig.2 Scanning electron micrograph of *Phytophthora capsici* mycelium treated with 1g/L cumin acid

2.1.2 病菌菌丝细胞微观结构变化 利用透射电子显微镜观察表明,未经过枯茗酸处理菌丝细胞形态结构完整,细胞壁外壁均匀,原生质稠密,可清晰的观察到细胞核,菌丝延伸生长点尖端的线粒体含量较多,整体结构完善,细胞呈现正常生长发育形态(图3)。经过0.5g/L浓度枯茗酸处理后菌丝细胞呈现出液泡化,脂肪颗粒有一定的增多,菌丝延伸生长点尖端的线粒体内嵴不明显(图4)。经过1g/L浓度枯茗酸处理后菌丝细胞总脂肪颗粒大量增加,几乎占据了细胞内60%的空间,细胞壁出现大量不规则增厚情况,液泡化更为明显(图5)。

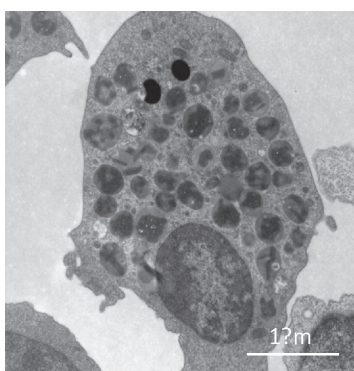


图4 未经枯茗酸处理辣椒疫霉病菌细胞形态  
Fig.3 Cell morphology of *Phytophthora capsici* without cumin treatment

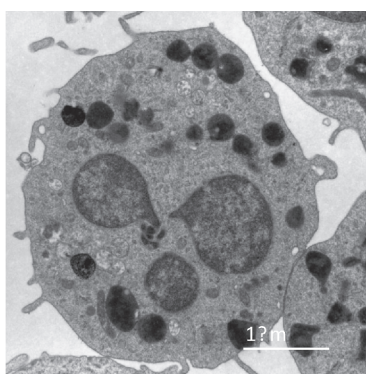


图5 0.5g/L浓度枯茗酸处理后辣椒疫霉病菌细胞形态  
Fig.4 Cell morphology of *Phytophthora capsici* after treatment with 0.5g/L cumin acid

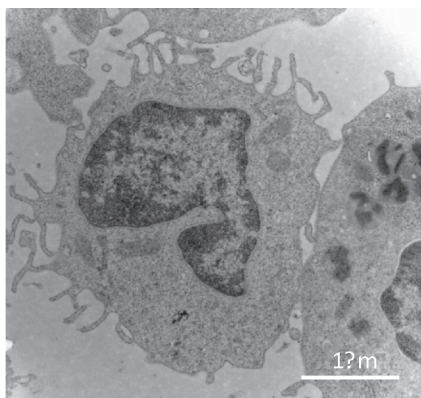


图6 1g/L浓度枯茗酸处理后辣椒疫霉病菌细胞形态  
Fig.5 Cell morphology of *Phytophthora capsici* after treatment with 1g/L cumin acid

## 2.2 对辣椒疫霉病菌菌丝细胞膜透性影响

利用DDS-307型电导率仪测定辣椒疫霉病菌在不同时间下的电导率见图6所示, 枯茗酸0.04g/L、0.1g/L作用3小时后电导率变化趋于缓和, 增长幅度不大。空白组(蒸馏水+菌液)和对照组(溶剂+菌液)测定结果随时间的变化相差不大, 几乎无明显差异。枯茗酸0.01g/L作用过程在0~20小时内整体

趋于急剧上升, 20小时后趋于平稳。

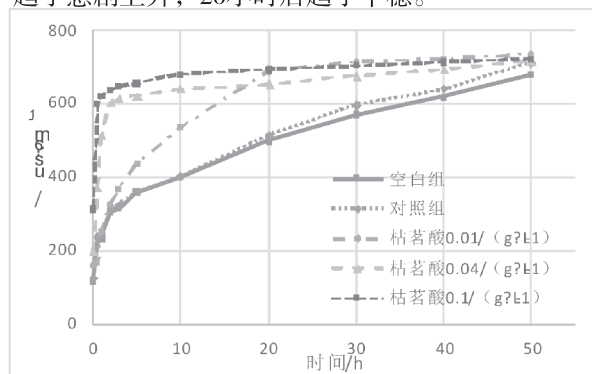


图7 枯茗酸不同浓度对辣椒疫霉病菌菌丝电导率的影响  
Fig.6 Effects of different concentrations of cumin on the conductivity of *Phytophthora capsici* mycelium

## 3 实验结果探讨

### 3.1 枯茗酸抑菌特性

实验测定了枯茗酸对辣椒疫霉病、番茄灰霉病、黄瓜白粉病的保护及治疗效果, 其中反应出枯茗酸对椒疫霉病接种的辣椒果实几乎无抑制效果。对番茄灰霉病具有较好的抑制效果, 其中0.5g/L、1g/L浓度枯茗酸保护效果分别为46.08%、48.15%, 治疗效果分别为19.45%、33.3%, 总体效果低于常用药剂速克灵(浓度0.2g/L)的保护及治疗效果70.67%、68.38%。

室内盆栽实验效果反应出枯茗酸对辣椒疫霉病、小麦白粉病和黄瓜白粉病三种病害都具有一定的保护和治疗效果。其中0.5g/L、1g/L浓度枯茗酸对辣椒疫霉病保护效果分别为39.48%、62.19%, 治疗效果分别为43.38%、59.56%。对小麦白粉病保护效果分别为58.67%、69.62%, 治疗效果分别为55.74%、66.54%。对黄瓜白粉病保护效果分别为为42.70%、63.17%, 治疗效果分别为39.40%、49.40%。

枯茗酸作为多类植物中可以提取出的抑菌成分, 提取原材料来源较为丰富, 有望在未来成为植物性成分直接在农耕地中应用, 且枯茗酸化学组结构简单, 几乎无污染, 也是制药工艺中重要的合成化合物, 将来具有重要的研究前景。

### 3.2 对辣椒疫霉病菌细胞膜透性影响

辣椒疫霉病菌细胞膜通透性主要由细胞膜结构决定, 外来物质在穿透细胞膜的过程受到多种因素影响, 包括温度、pH值、辐射等。不同浓度枯茗酸对细胞膜的影响过程初期差异较大, 在50小时后总

体趋于一致,反应出了高浓度的桔萆酸在早期对辣椒疫霉病菌细胞膜的影响较为剧烈,短时间内能快速的影响细胞膜的通透性。

桔萆酸中含有大量的羧酸根离子,能极大的改变细胞环境中的pH值,桔萆酸浓度越大,羧酸根离子含量越多,导致环境溶液酸性越强,促使细胞膜通透性更强。但最终由于反应时间的持续,整个溶液内部中细胞膜内外渗透性逐渐趋于平衡,造成了最终对细胞膜的通透性影响能力减弱。

#### 参考文献

- [1]胡林峰,陈从珍,易晓华,等.孜然种子提取物桔萆醛和桔萆酸抑菌作用研究[J].西北植物学报,2008,28(11):2349-2354.
- [2]高艳清,商士斌,李健.二氢桔萆酸酯衍生物的合成[J].化学试剂,2011,33(6):493-496.
- [3]熊李波,秦强,胡培芳,等.混料设计优化孜然、花椒、芥子混合精油对4种果蔬采后真菌的抑菌效果[J].食品科学,2019,40(3):208-216.
- [4]高艳清,王丹,商士斌,等.二氢桔萆酰基硫脲的合成及抑菌活性研究[J].林产化学与工业,2012,32(3):23-27.
- [5]胡林峰,冯俊涛,张兴,等.孜然种子中杀菌活性成分分离及结构鉴定[J].农药学报,2007,9(4):330-334.
- [6]冯俊涛,韩立荣,范瑞娟,等.桔萆酸对辣椒疫霉病菌生长发育的影响[J].中国农业科学,2012,45(13):2628-2635.
- [7]黄璐,刘艳丽,李笑然,等.孜然籽的化学成分研究[J].中草药,2017,48(17):3480-3485.
- [8]王勇,孙扬,周明霞,等.14种小分子有机酸的抑菌活性筛选[J].河北农业大学学报,2018,41(4):22-28.
- [9]刘文妮,燕璐,沈科萍,等.桔萆醛、孜然精油及其微胶囊对两种储粮害虫的熏蒸效果比较[J].食品工业科技,2015,36(15):330-333,337.
- [10]赵昊昱.桔萆醛的合成[J].江苏化工,2008,36(1):33-35.
- [11]杨婷,史红安,李聪丽,等.13种萜类化合物对胶孢炭疽菌和链格孢的抑制活性[J].植物保护,2017,43(2):192-195.
- [12]徐丹,卫梦绮,李亚俊,等.孜然精油对产毒黄曲霉的抑制活性研究[J].天然产物研究与开发,2018,30(9):1601-1607.
- [13]聂莹,李淑英,齐小雨,等.孜然油对几种果蔬贮藏致病菌抑制作用分析[J].生物技术通报,2013,(4):167-171.
- [14]朱羽尧,王美珍,陈楠,等.不同提取预处理方法对孜然精油提取成分组成的影响[J].中国野生植物资源,2018,37(3):19-23.
- [15]任国瑜,任旭,李健,等.烯效唑Fe(II)配合物的合成、结构及生物活性研究[J].当代化工,2019,48(08):1682-1685.

[责任编辑 王军利]

## Pharmacodynamic Analysis of Cumin Acid and Its Inhibition on Phytophthora Capsicum

ZHANG Juan

(Xianyang Vocational & Technical College, Xianyang, Shaanxi 712000)

**Abstract:** In order to investigate the biological inhibition of phytophthora in vivo on Phytophthora capsicum, tomato gray mold, cucumber powdery mildew and wheat powdery mildew, as well as the efficacy of phytophthora capsicum, the comparison experiments were carried out with the conventional pesticides furosemide, metaxyl and triazolone. The results showed that Wumming acid had good biological activity inhibition effect on Phytophthora capsicum, tomato gray mold and cucumber powdery mildew, and had no obvious effect on the fruit of Phytophthora capsicum inoculated. It was observed by optical microscope and electron microscope that Kuming acid had great influence on the biological activity and morphology of Phytophthora capsicum. At the same time, it can effectively change the permeability of cell membrane of Phytophthora capsicum, and the higher the concentration of dry tea acid, the more obvious the change effect in a short time, and finally tend to be stable.

**Key words:** Cuminic acid, Pharmacodynamic analysis, antibacterial effect, Phytophthora capsicum