

doi:10.3969/j.issn.0253-2417.2024.04.014

莪术挥发油的提取、成分分析及抗植物病原真菌活性研究



粟华生¹, 徐仁乐², 吴佳盈², 邓日建³, 李健^{2*}

(1.广西农业职业技术大学 食品药品工程学院, 广西 南宁 530007; 2.西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨凌 712100; 3.广西壮族自治区药用植物园, 广西 南宁 530023)

摘要:通过水蒸气蒸馏法从莪术叶中提取莪术挥发油(ZTO), 利用 GC-MS 仪对其化学成分进行分析, 并采用菌丝生长速率法测试了 ZTO 对水稻纹枯病菌、黄瓜炭疽病菌、玉米弯孢菌、小麦赤霉病菌、苹果腐烂病菌和辣椒疫霉 6 种植物病原菌的抑制活性; 通过透射电镜和激光共聚焦显微镜观察了 ZTO 对水稻纹枯病菌菌丝超微结构的影响, 并分析了 ZTO 对水稻纹枯病菌生理学和防御酶活性的影响。结果表明: ZTO 中含有 28 种有效成分, 其中石竹素 3.27%、莪术烯 5.69%、桉叶油醇 5.73%、蓝桉醇 6.27%、莪术酮高达 38.16%, 其余均低于 3%; ZTO 对水稻纹枯病菌具有较好的抑制效果, 其半数致死浓度 (EC_{50}) 为 14.784 mg/L, 略低于阳性对照丙环唑 (EC_{50} 值为 10.521 mg/L); 相比空白组, ZTO 处理后水稻纹枯病菌菌丝的鲜质量和干质量分别降低了 48.47% 和 62.86%, 菌丝的可溶性蛋白质质量分数降低了 26.32%, 180 min 时相对电导率值上升了 16.68%, 超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD)、过氧化氢酶 (CAT)、多酚氧化酶 (PPO) 酶活均有一定程度的下降, 其中 SOD 和 CAT 的酶活分别降低 37.82% 和 54.02%。分析表明: ZTO 对菌丝细胞膜和细胞壁具有一定的破坏作用, 导致菌丝体内电解质大量外泄, ZTO 进入菌丝体后对 SOD 和 CAT 产生一定的抑制作用, 致使菌丝体内的活性氧 (ROS) 不能得到有效的清除, ROS 大量累积, 进而造成菌丝体的生理生化功能紊乱, 并最终阻碍了菌丝的生长。

关键词: 莪术叶; 莪术挥发油; 水稻纹枯病菌; 作用方式

中图分类号: TQ35

文献标志码: A

文章编号: 0253-2417(2024)04-0113-08

引文格式: 粟华生, 徐仁乐, 吴佳盈, 等. 莪术挥发油的提取、成分分析及抗植物病原真菌活性研究[J]. 林产化学与工业, 2024, 44(4): 113-120.

Extraction, Component Analysis, and Antifungal Activity on Plant Pathogenic Fungi of Zedoary Turmeric Volatile Oil

SU Huasheng¹, XU Renle², WU Jiaying², DENG Rijian³, LI Jian²

(1. College of Food and Drug Engineering, Guangxi Vocational University of Agriculture, Nanning 530007, China;

2. College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling 712100, China; 3. Guangxi Botanical

Garden of Medicinal Plants, Nanning 530023, China)

Abstract: Zedoary turmeric volatile oil (ZTO) was extracted from zedoary turmeric leaves by steam distillation method, and its chemical composition was analyzed using GC-MS. The inhibitory activities of ZTO against six plant pathogens, including *Rhizoctoria solani*, *Colletotrichum orbiculare*, *Curvularia lunata*, *Fusarium graminearum*, *Valsa mali*, *Phytophthora capsici* were measured using the mycelial growth rate method. The effect of ZTO on the ultrastructure of *R. solani* mycelium was observed by transmission electron microscopy and confocal laser confocal microscopy. The effects of ZTO on the physiology and enzyme activity of *R. solani* were also analyzed. The results showed that ZTO contained 28 effective ingredients, where caryophyllin was 3.27%, curcumene was 5.69%, eucalyptol was 5.73%, eudesmol was 6.27%, curcumone was as high as 38.16%, and the

收稿日期: 2024-01-31

基金项目: 广西农业科技项目 (Z202231); 广西中医药多学科交叉创新团队项目 (GZKJ2309)

作者简介: 粟华生 (1976—), 男, 副教授, 广西资源人, 主要从事中药活性成分提取分离、鉴定工作

* 通讯作者: 李健, 教授, 研究领域为天然产物的提取、鉴定、改性和生物活性测试; E-mail: ericlee99@nwsuaf.edu.cn.

rest was less than 3%. ZTO exhibited a significant inhibitory effect on *R. solani*, and its median lethal concentration (EC_{50} value) was 14.784 mg/L, slightly lower than that of the positive control propiconazole (EC_{50} value of 10.521 mg/L). Compared with the blank group, the fresh and dry weight of *R. solani* mycelia treated with ZTO decreased by 48.47% and 62.86%, respectively. The soluble protein of the mycelia decreased by 26.32%, and the relative conductivity value increased by 16.68% after 180 minutes. The activities of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), catalase (CAT) and polyphenol oxidase (PPO) all decreased to a certain extent, and the activities of SOD and CAT decreased by 37.82% and 54.02%, respectively. The analysis showed that ZTO had a certain destructive effect on the cell membrane and cell wall of mycelium, leading to a considerable amount of electrolyte leakage in the mycelium. After entering the mycelia, ZTO exhibited a certain inhibitory effect on SOD and CAT enzymes, resulting in the reactive oxygen species (ROS) in the mycelium could not be effectively removed and a large amount of ROS accumulation, which further caused physiological and biochemical dysfunction of the mycelium, and ultimately hindered the growth of the mycelium.

Key word: zedoary leaves; zedoary turmeric oil; *Rhizoctonia solani*; mode of action

植物病菌对粮食生产造成了巨大危害,由植物病菌引起的植物病害超过 1 万种,占全年作物总损失的 10%~30%^[1-2],因此,植物病菌的防控刻不容缓。使用传统化学农药控制植物病害虽然操作简单、见效快,但也会给生态环境和人类健康带来严重的灾难^[3]。因此,采用绿色科学的防控手段迫在眉睫。莪术为姜科植物蓬莪术、广西莪术的干燥根茎,是广西的道地药材。大量研究表明莪术具有抗肿瘤、抗炎、抗病毒、抗氧化、抗菌、护肝等多种生物活性^[4-5]。莪术叶是莪术植株中非药用部位,含有大量挥发性化合物,具有潜在的开发利用价值。张丹媚等^[6]测试了广西莪术挥发油对松赤枯病菌、玉米纹枯病菌、玉米弯孢病菌、胶孢炭疽杆菌、水稻稻瘟病菌和小麦赤霉病菌的抗菌活性,结果表明:广西莪术挥发油对松赤枯病菌具有较好的抑制效果(IC_{50} 值为 6.8 mL/L),这是因为广西莪术挥发油能作用于病菌的细胞壁和细胞器,进而达到抗病菌的目的,但是其具体的作用方式并不清晰。菌丝生理学指标的检测,如超微结构的改变、活性氧(ROS)的累计、菌丝质量的变化、细胞膜通透性以及防御酶活性改变等,对于探究广西莪术挥发油(ZTO)的作用方式具有重要的作用。基于上述研究背景,本研究利用水蒸气蒸馏法从莪术叶中提取 ZTO,采用菌丝生长速率法测试 ZTO 的抗病菌活性,通过研究菌丝处理前后生理学的变化初步探究 ZTO 的作用方式,以期对莪术叶中活性成分的高值化利用提供理论依据。

1 实 验

1.1 原料、试剂与仪器

广西莪术(*Curcuma kwangsiensis* S. G. Lee et C. F. Liang)叶由广西壮族自治区药用植物园提供,采摘于 2023 年 10 月。水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*)、黄瓜炭疽病菌(*Colletotrichum orbiculare*)、玉米弯孢菌(*Curvularia lunata*)、小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*)、苹果腐烂病菌(*Valsa mali*)、辣椒疫霉(*Phytophthora capsici*)6 种植物病原菌由西北农林科技大学植物保护学院提供;其他试剂均为市售分析纯。

TRACE1310-ISQLT 气相色谱-质谱联用(GC-MS)仪,美国赛默飞世尔科技有限公司;DDB-12H 笔式电导率计,杭州齐威仪器有限公司;TECNAI G2 SPIRIT BIO 透射电镜(TEM),美国 FEI 公司;LEICA TCS SP8 激光共聚焦显微镜,德国莱卡仪器有限公司;MULTISKAN GO 全波长酶标仪,芬兰 THERMO FISH 公司。

1.2 莪术挥发油(ZTO)的提取及活性成分分析

根据文献[7]报道的方法,采用“水蒸气蒸馏法”提取莪术挥发油。首先将阴干的莪术叶粉碎(过粒径为 2 mm 的筛),取粉末 200 g,采用水蒸气蒸馏法提取 4 h,收集油水混合液(约 20 mL),按体积比 1:10 加入石油醚提取 9 h,减压蒸馏除去石油醚,二氯甲烷萃取后再减压蒸馏,即得莪术挥发油(ZTO)。

ZTO 中活性成分的分析:取 20 mg ZTO 溶于 1 mL 的甲醇溶液,并在 GC-MS 仪中测试 ZTO 的活性成分。色谱条件:TRACE1310-ISQLT 气相色谱仪,wm-5ms 色谱柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm),柱温

150 ℃,以 3.0 ℃/min 升温至 230 ℃后,以 10 ℃/min 升温至 280 ℃,保持 10 min。进样口温度为 250 ℃,载气为氦气,流量 0.8 mL/min,进样量为 1 μL。质谱条件:电离方式为电子电离(EI)源,传输线温度 240 ℃,离子源温度 280 ℃,质谱扫描范围 55 ~ 500 u。

1.3 抗真菌活性测试

根据文献[8~10]报道的方法,采用菌丝生长速率法测试 ZTO 对 6 种植物病原菌的抑制活性。首先,将 ZTO 溶于二甲基亚砜(DMSO)溶液作为标准液,取适量标准液制备质量浓度为 50 mg/L 的含药马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)。然后,将上述 6 种植物病原菌接种到 PDA 中心,并在 25 ℃人工气候箱中培养。最后,筛选出抑制率高于 50% 的植物病原菌,在 50、25、12.5、6.25、3.13、1.56 mg/L 的质量浓度下进一步测试其抗菌效果。根据式(1)计算其抑制率(η)并通过 SPSS 22.0 软件计算 ZTO 对水稻纹枯病菌的半数致死浓度(EC_{50} 值)。

$$\eta = (D_{CK} - D_T) / (D_{CK} - 5) \times 100\% \quad (1)$$

式中: D_{CK} —空白组的菌落直径,mm; D_T —处理组的菌落直径,mm; 5—菌饼的直径,mm。

1.4 ZTO 对水稻纹枯病菌菌丝微观结构的影响

1.4.1 TEM 分析 采用 TEM 观察 ZTO 处理前后水稻纹枯病菌菌丝的超微结构变化,根据文献[11]报道的方法,分别使用 DMSO 和 ZTO(EC_{50} 值)处理的水稻纹枯病菌作为空白组和处理组并进行取样。空白组和处理组经 4% 戊二醛植物固定液固定 6 h 以上、PBS 漂洗(5、10、15、20、25 和 30 min 各漂洗 1 次,下同)、1% 锇酸固定 1.5 h、PBS 漂洗;然后,采用等体积比的白胶和乙醇混合液渗透菌丝 2 次(第一次 8 h,第二次 6 h)、纯白胶包埋 48 h、烘干(60 ℃)、切样和铅铀染色处理后,在 TEM 下观察菌丝形态。

1.4.2 激光共聚焦显微镜分析 通过激光共聚焦显微镜观察水稻纹枯病菌菌丝体内 ROS 的累积情况,根据文献[12]报道的方法,将水稻纹枯病菌在 PDA 培养基上活化培养 2 d 后,用直径 5 mm 的打孔器取 10 个菌饼置于 100 mL 马铃薯葡萄糖肉汤培养基(PDB)中,25 ℃摇床培养 1 d 后,处理组加入 ZTO(EC_{50} 值),空白组加入等体积 DMSO,继续培养 2 d。将菌丝尖端挑出,用 10 μmol/L 的 2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)染色 10 min,0.1 mol/L PBS 缓冲液漂洗 2 次,每次 10 min,置于载玻片上并使用激光共聚焦显微镜拍照,观察处理前后菌丝体内 ROS 的累积情况(最大激发波长为 495 nm,最大发射波长为 529 nm)。

1.5 ZTO 对水稻纹枯病菌生理学的影响

1.5.1 菌丝干质量和鲜质量 水稻纹枯病菌的培养方法同 1.4.2 节,菌丝经减压抽滤后,用分析天平称量菌丝的鲜质量;60 ℃烘干 5 h 后测量菌丝的干质量。

1.5.2 菌丝可溶性蛋白含量 水稻纹枯病菌的培养方法同 1.4.2 节,根据文献[13]报道的方法:取鲜样 0.2 ~ 0.5 g,用蒸馏水研磨成匀浆后,3 000 ~ 4 000 r/min 离心 10 min,上清液即为空白组和处理组的提取液。取 6 支具塞试管,分别加入 0、20、40、60、80 和 100 mg/L 的牛血清蛋白标准液 1 mL,再向各管中加入 5 mL 考马斯亮蓝试剂,静置 5 min 左右,以未添加牛血清蛋白标准液的试管为空白对照,在 595 nm 下比色,测定吸光度,以蛋白质含量为横坐标,以吸光度为纵坐标绘制标准曲线。吸取样品提取液 1.0 mL(根据蛋白质含量适当稀释),放入试管中,每个样品重复 3 次,加入 5 mL 考马斯亮蓝试剂,摇匀,放置 2 min 待反应完成,在 595 nm 下比色,测定吸光度,并通过标准曲线计算蛋白质含量,根据式(2)计算处理组和空白组菌丝的可溶性蛋白质量分数(w ,mg/g)。

$$w = m \times V_t / (m_f \times V_s) \quad (2)$$

式中: m —从标准曲线计算得到的 1 mL 提取液中蛋白质的质量,mg; V_t —提取液总体积,mL; m_f —样品鲜质量,g; V_s —测定时加样体积,mL。

1.5.3 菌丝细胞膜通透性 细胞膜通透性可以反映 ZTO 对水稻纹枯病菌的细胞膜损伤,根据文献[14~16]报道的方法:首先将菌丝接种在 PDB 培养基上,振荡培养 3 d,经真空抽滤、无菌水洗涤后称取 0.3 g,加入 30 mL 的蒸馏水,处理组加入 ZTO(EC_{50} 值),空白对照组添加等体积的 DMSO,每组设置 3 个重复。最后,使用电导率计测试处理组和空白组在 0、30、60、90、120、150 和 180 min 时的电导率值

(σ_0)和煮沸后菌丝体的电导率值(σ_1),根据式(3)计算处理组和空白组菌丝的相对电导率(R)。

$$R = \sigma_0 / \sigma_1 \times 100\% \tag{3}$$

1.6 ZTO 对水稻纹枯病菌菌丝防御酶活性的影响

1.6.1 超氧化物歧化酶(SOD)活性测试 水稻纹枯病菌的培养方法同 1.4.2 节,根据文献[17]报道的方法,取鲜样 0.5 g,用蒸馏水研磨成匀浆后,3 000~4 000 r/min 离心 10 min,上清液即为空白组和处理组的粗酶液。取 7 支试管编号 1~7,并加入 5 mL 的氮蓝四唑(NBT)反应液;1~3 号试管加入空白组粗酶液 0.15 mL,4~6 号试管加入处理组粗酶液 0.15 mL 并摇匀,7 号管不加粗酶液,用于空白调零;25 ℃,5 000 Lx 日光下光照 20 min 后,在 560 nm 波长下测定吸光度值,SOD 活性以抑制 NBT 光还原 50% 所需的酶量为 1 个酶活性单位,根据式(4)计算处理组和空白组菌丝的 SOD 酶活(Y_{SOD} ,U/(g·min))。

$$Y_{\text{SOD}} = (A_{\text{ck}} - A_{\text{e}}) \times V / (0.5 \times m_{\text{f}} \times t \times V_{\text{t}}) \tag{4}$$

式中: A_{ck} —光照对照管的吸光度值; A_{e} —样品管的吸光度值; V —酶提取液总体积,mL; m_{f} —样品鲜质量,g; V_{t} —测定时所用的酶液体积,mL; t —反应时间,min。

1.6.2 过氧化物酶(POD)活性测试 空白组和处理组粗酶液的制备同 1.6.1 节,根据文献[18]报道的方法,取 7 支试管编号 1~7,加入 pH 值 6.0 的 0.05 mol/mL 磷酸缓冲液 2 mL,2% 过氧化氢 2 mL、0.05 mol/mL 愈创木酚 1 mL;1~3 号试管加入空白组粗酶液 0.15 mL,4~6 号试管加入处理组粗酶液 0.15 mL 并摇匀,7 号管不加粗酶液,用于空白调零;470 nm 波长下测定初始吸光度值,反应 5 min,测定反应后的吸光度值。以每分钟吸光度值变化 0.01 定义为 1 个酶活性单位,按照式(5)计算处理组和空白组菌丝的 POD 酶活。

$$Y = (A_0 - A_1) \times V / (0.01 \times m_{\text{f}} \times t \times V_{\text{t}}) \tag{5}$$

式中: Y —酶活,U/(g·min); A_0 —初始吸光度值; A_1 —5 min 后吸光度值。

1.6.3 过氧化氢酶(CAT)活性测试 空白组和处理组粗酶液的制备同 1.6.1 节,根据文献[19]报道的方法,取 7 支试管编号 1~7,加入 0.2% 过氧化氢 1 mL,蒸馏水 1.9 mL;1~3 号试管加入空白组粗酶液 0.1 mL,4~6 号试管加入处理组粗酶液 0.1 mL 并摇匀,7 号管不加粗酶液,用于空白调零;立即置于 240 nm 波长下测定初始吸光度值,3 min 后再次测定管内液体的吸光度值。以每分钟吸光度值变化 0.01 定义为 1 个酶活性单位,按照式(5)计算处理组和空白组菌丝的 CAT 酶活。

1.6.4 多酚氧化酶(PPO)活性测试 空白组和处理组粗酶液的制备同 1.6.1 节,根据文献[20]报道的方法,取 7 支试管编号 1~7,加入 pH 值 6.0 的 0.05 mol/mL 磷酸缓冲液 3.8 mL,邻苯二酚 1 mL;1~3 号试管加入空白组粗酶液,4~6 号试管加入处理组粗酶液,7 号管不加粗酶液,用于空白调零;398 nm 波长下测定起始吸光度值;随后在 35 ℃ 恒温水浴保温 20 min,迅速冰浴并测定吸光度。以每分钟吸光度值变化 0.01 定义为 1 个酶活性单位,按照式(5)计算处理组和空白组菌丝的 PPO 酶活。

2 结果与讨论

2.1 莪术挥发油的成分分析

ZTO 的总离子流色谱见图 1,其中主要的倍半萜类化合物及其含量见表 1。

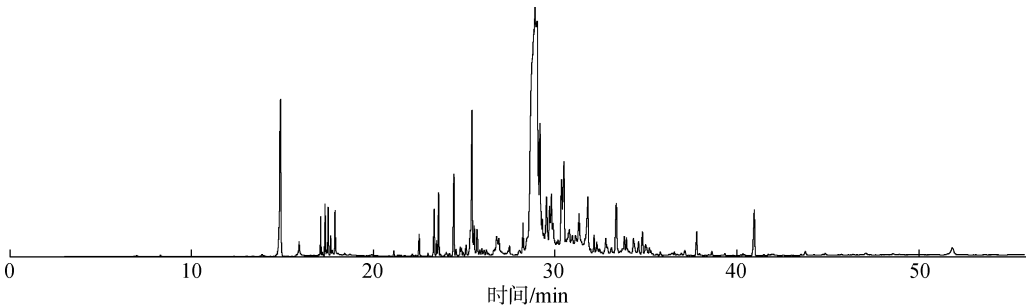


图 1 ZTO 的总离子流色谱

Fig.1 The total ion flow chromatogram of ZTO

表 1 ZTO 中主要的倍半萜类化合物及其含量
Table 1 Main sesquiterpenes and their contents in ZTO

编号 No.	保留时间/min retention time	化合物名称 compound name	分子式 molecular formula	CAS	相对峰面积/% relative peak area
1	13.00	α -蒎烯 α -pinene	C ₁₀ H ₁₆	80-56-8	0.02
2	13.87	β -蒎烯 β -pinen	C ₁₀ H ₁₆	127-91-3	0.09
3	14.87	桉叶油醇 cineole	C ₁₀ H ₁₈ O	470-82-6	5.73
4	17.08	樟脑 camphor	C ₁₀ H ₁₆ O	464-48-2	0.92
5	17.32	龙脑 DL-2-bornanol	C ₁₀ H ₁₈ O	464-45-9	2.23
6	17.41	α -松油醇 terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	98-55-5	1.19
7	17.64	4-萜烯醇 terpinine-4-ol	C ₁₀ H ₁₈ O	562-74-3	0.41
8	18.03	桃金娘烯醇(-)-myrtenol	C ₁₀ H ₁₆ O	515-00-4	0.04
9	18.68	L-乙酸香芹酯 carvyl acetate	C ₁₂ H ₁₈ O ₂	97-42-7	0.04
10	19.86	乙酸龙脑酯(+)-bornyl acetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	76-49-3	0.06
11	21.11	萜品油烯 terpinolene	C ₁₀ H ₁₆	586-62-9	0.14
12	22.50	β -榄香烯 β -elemene	C ₁₅ H ₂₄	515-13-9	0.55
13	23.46	异丁香烯 isocaryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	118-65-0	0.37
14	23.57	香叶烯 bicyclogermacrene	C ₁₅ H ₂₄	24703-35-3	1.69
15	24.41	石竹烯 caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	6753-98-6	2.72
16	25.41	莪术烯 curzerene	C ₁₅ H ₂₀ O	17910-09-7	5.69
17	25.53	佛术烯 eremophilene	C ₁₅ H ₂₄	10219-75-7	0.69
18	26.76	桉油烯醇 spathulenol	C ₁₅ H ₂₄ O	6750-60-3	0.71
19	28.21	蓝桉醇 globulol	C ₁₅ H ₂₆ O	489-41-8	0.96
20	28.87	莪术酮 curzerenone	C ₁₅ H ₁₈ O ₂	20493-56-5	38.16
21	29.68	古芸烯 isospathulenol	C ₁₅ H ₂₄ O	88395-46-4	1.08
22	29.77	石竹素 caryophyllene oxide	C ₁₅ H ₂₄ O	1139-30-6	3.27
23	30.33	β -桉叶醇 β -eudesmol	C ₁₅ H ₂₆ O	473-15-4	2.66
24	30.47	蓝桉醇 globulol	C ₁₅ H ₂₆ O	489-41-8	6.27
25	32.28	莪术二酮 curdione	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	13657-68-6	0.45
26	33.34	莪术呋喃二烯酮 furanodienone	C ₁₅ H ₁₈ O ₂	24268-41-5	2.76
27	35.77	莪术双环烯酮 curcumenone	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	100347-96-4	0.14
28	40.94	蓬莪术环氧酮 zederone	C ₁₅ H ₁₈ O ₃	7727-79-9	1.96

由图 1 和表 1 可知,ZTO 中共鉴定出 28 种有效成分,包含萜类(单萜、倍半萜)、酮类、醇类、酸(酯)类等化合物。其中,龙脑、 α -松油醇、香叶烯、石竹烯、古芸烯、 β -桉叶醇、莪术呋喃二烯酮、蓬莪术环氧酮的质量分数在 1% ~ 3% 之间,石竹素为 3.27%,莪术烯为 5.69%,桉叶油醇为 5.73%,蓝桉醇为 6.27%,莪术酮高达 38.16%,其余化合物的含量均低于 1%。大量文献报道,莪术类化合物具有抗肿瘤^[21]、杀菌^[22]等生物活性,但是关于农用抗真菌的研究却鲜有报道。

2.2 抗真菌活性分析

在 ZTO 提取鉴定的基础上,通过菌丝生长速率法测试 ZTO 质量浓度为 50 mg/L 时对 1.1 节 6 种植物病原菌的抑制效果。测试结果表明,ZTO 对 6 种植物病原菌具有不同程度的抑制效果,其中 ZTO 为 50 mg/L 时对水稻纹枯病菌的抑制率为 92.87%,对其他 5 种植物病原菌的抑制效果相对较差(抑制率介于 5% ~ 20% 之间)。ZTO 对水稻纹枯病菌的抗病菌活性复筛结果见表 2。

表 2 莪术挥发油和丙环唑对水稻纹枯病菌的抗病菌活性复筛

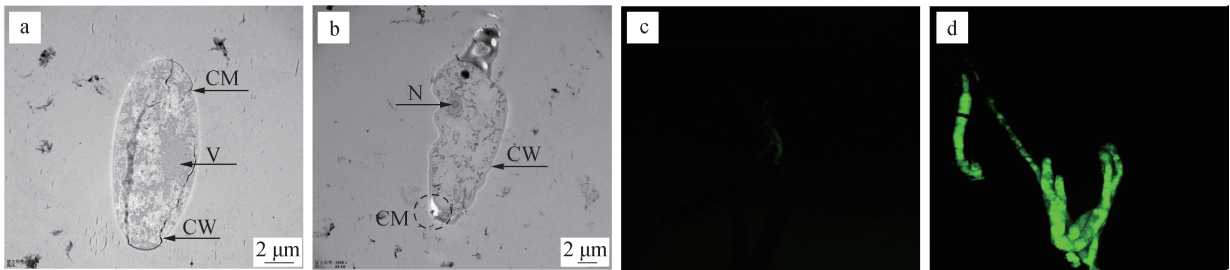
Table 2 In vitro antifungal activity of ZTO and propiconazole on R. solani

样品 sample	回归方程 regression equation	R ²	EC ₅₀ /(mg·L ⁻¹)	95% 置信区间 95% confidence interval
丙环唑 propiconazole	y = -3.00 + 2.98x	0.926	10.521	6.156 ~ 16.376
ZTO	y = -3.23 + 2.63x	0.915	14.784	7.610 ~ 27.136

由表2可知,ZTO对水稻纹枯病菌具有较好的抑制效果,其 EC_{50} 值为14.784 mg/L,略低于阳性对照丙环唑(EC_{50} 值为10.521 mg/L)。

2.3 ZTO对水稻纹枯病菌微观结构的影响

ZTO处理前后水稻纹枯病菌菌丝的TEM图见图2(a)~图2(b)。由图可知,未经过处理的菌丝细胞圆润,其细胞膜、细胞壁和液泡等超微结构清晰可见(图2(a)),而处理组菌丝的细胞呈现出明显的扭曲,细胞膜和细胞壁出现了分离现象(图2(b)),表明ZTO对水稻纹枯病菌的超微结构具有一定的影响。ROS是一种重要的信号分子,可以参与多种细胞代谢过程,但过量的ROS累积将会氧化脂质和蛋白质,破坏细胞结构,引起细胞膜的破裂和细胞凋亡。ROS染色结果见图2(c)~图2(d)。由图可知,空白组呈现出微弱的荧光信号,而处理组荧光信号十分强烈,这表明ZTO能造成ROS的大量累积。由此可以推测:经ZTO处理后,菌丝体内ROS大量累积,菌丝体内代谢紊乱,进而抑制菌丝生长。



CM:细胞膜 cell membrane;CW:细胞壁 cell wall;V:液泡 vacuole;N:细胞核 nucleus
TEM:a.空白组 control,b.处理组 treatment; CLSM:c.空白组 control,d.处理组 treatment

图2 ZTO处理前后水稻纹枯病菌菌丝的TEM和激光共聚焦显微镜(CLSM)

Fig.2 TEM and confocal laser scanning microscope(CLSM) of *R. solani* mycelium before and after ZTO treatment

2.4 ZTO对水稻纹枯病菌生理学的影响

2.4.1 菌丝生长量 菌丝的干质量和鲜质量可以直观反映ZTO对水稻纹枯病菌生长量的影响,测试结果显示:空白组和处理组的鲜质量分别为1.63和0.84 g,干质量分别为0.35和0.13 g。由数据可以看出,经过ZTO处理后,菌丝的鲜质量和干质量均有明显降低,相比空白组分别降低了48.47%和62.86%。

2.4.2 可溶性蛋白含量 可溶性蛋白是生命体重要的渗透调节物质和营养物质,其含量的增加和积累能提高细胞的保水能力,从而对细胞的生命物质及生物膜起到保护作用。测试结果显示:空白组和处理组的可溶性蛋白质量分数分别为0.19和0.14 mg/g。可见,经过ZTO处理后,菌丝的可溶性蛋白质量分数降低了26.32%。

2.4.3 细胞膜通透性 相对电导率可以衡量处理前后菌丝体内电解质外渗情况,继而反映ZTO对水稻纹枯病菌细胞膜通透性的影响。ZTO处理前后水稻纹枯病菌菌丝的相对电导率结果见图3。由图可知,在前60 min内,相对电导率均急速上升,且处理组相对电导率上升更快;60~180 min时,相对电导率值趋于平稳,且处理组最终相对电导率值(68.56%)相比空白组(58.76%)上升了16.68%,表明ZTO对水稻纹枯病菌细胞膜具有一定的破坏作用,这与TEM分析结果基本一致。

2.5 ZTO对水稻纹枯病菌防御酶活性的影响

SOD是一种源于生命体的活性物质,能将生物体在新陈代谢过程中产生的超氧化物转化为过氧化物,POD具有消除过氧化氢及酚类、胺类、醛类、苯类毒性的双重作用,CAT能催化过氧化氢分解成氧和水,而PPO能消除氧自由基对生物体的伤害。ZTO对水稻纹枯病菌菌丝防御酶活性的影响见表3。由

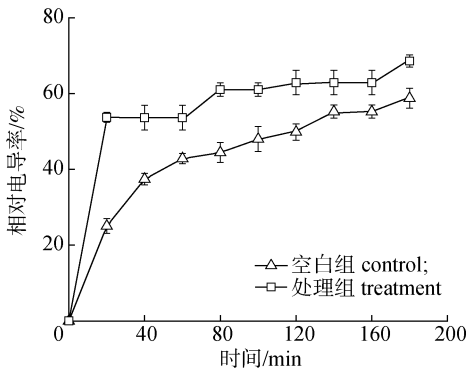


图3 ZTO处理前后水稻纹枯病菌菌丝的相对电导率
Fig.3 Relative conductivity of *R. solani* mycelium before and after ZTO treatment

表 3 可知,ZTO 对 SOD、POD、CAT 和 PPO 酶均有不同程度的抑制作用,其中 ZTO 对 SOD 和 CAT 酶活性影响最为明显,其分别降低 37.82% 和 54.02%。

基于以上结果可以推测:莪术挥发油对菌丝的细胞膜和细胞壁具有一定的破坏作用,导致菌丝体内电解质大量外泄,莪术挥发油进入菌丝体后对 SOD 和 CAT 酶产生一定的抑制作用,致使菌丝体内的 ROS 不能得到有效的清除,进而造成菌丝体的生理生化功能紊乱,并最终阻碍了菌丝的生长。

表 3 ZTO 处理对水稻纹枯病菌防御酶活性的影响

Table 3 Effect of ZTO treatment on the mycelial defense enzyme activity of <i>R. solani</i>				U/(g·min)
组别 group	SOD	POD	CAT	PPO
空白组 control	2.38	202.94	213.24	40.97
处理组 treatment	1.48	189.08	98.04	35.71

3 结 论

3.1 通过水蒸气蒸馏法从莪术中提取莪术挥发油(ZTO),利用 GC-MS 仪对其化学成分进行分析,并采用菌丝生长速率法测试了 ZTO 对 6 种植物病原菌的抑制活性。结果表明:ZTO 中含有 28 种有效成分,其中石竹素 3.27%、莪术烯 5.69%、桉叶油醇 5.73%、蓝桉醇 6.27%、莪术酮高达 38.16%;ZTO 对水稻纹枯病菌具有较好的抑制效果,其 EC₅₀ 值为 14.784 mg/L,略低于阳性对照丙环唑(10.521 mg/L)。

3.2 菌丝的生理学测试结果表明:ZTO 能造成菌丝体内电解质大量外泄,这是因为 ZTO 对水稻纹枯病菌的超微结构具有一定的破坏作用;此外,经 ZTO 处理后菌丝体内 ROS 大量累积,这是因为莪术挥发油对 SOD 和 CAT 酶活具有一定的抑制效果,使 SOD 和 CAT 酶活分别下降 37.82% 和 54.02%。本研究为拓展莪术叶在农业病害防治领域的利用提供了一定的理论依据,也为林产资源的深度开发提供了借鉴。

参考文献:

[1]LI K C,XING R E,LIU S,et al. Microwave-assisted degradation of chitosan for a possible use in inhibiting crop pathogenic fungi[J]. International Journal of Biological Macromolecules,2012,51(5):767-773.

[2]XU R L,GU S H,CHEN K,et al. Discovery of rosin-based acylhydrazones as potential antifungal agents against rice *Rhizoctonia solani* for sustainable crop protection[J]. Pest Management Science,2023,79(2):655-665.

[3]DELIBERTO S T,WERNER S J. Review of anthraquinone applications for pest management and agricultural crop protection[J]. Pest Management Science,2016,72(10):1813-1825.

[4]杜星锴,何俊,王宇. 莪术抗肿瘤活性成分的网络药理学研究[J]. 华西药理学杂志,2022,37(3):257-262.

DU X K,HE J,WANG Y. Study on anti-tumor active ingredients of *Curcuma zedoaria* by network pharmacological[J]. West China Journal of Pharmaceutical Sciences,2022,37(3):257-262.

[5]郑洋,王佳慧,赵铁建,等. 莪术醇对 RAW264.7 巨噬细胞 M1/M2 表型分化以及炎症因子分泌的影响[J]. 中华中医药学刊,2022,40(11):77-81.

ZHENG Y,WANG J H,ZHAO T J,et al. Effect of curcumol on M1/M2 phenotypic differentiation of RAW264.7 macrophages and secretion of inflammatory factors[J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine,2022,40(11):77-81.

[6]张丹媚,李群,马丹炜,等. 广西莪术油抑制植物病原真菌活性的研究[J]. 安徽大学学报(自然科学版),2008,32(1):81-84.

ZHANG D M,LI Q,MA D W,et al. Study on antifungal activity of oil from *Curcuma kwangsiensis* S. G. Lee et C. F. Liang[J]. Journal of Anhui University(Natural Science Edition),2008,32(1):81-84.

[7]罗莎,赵祺,郭月琴,等. 温莪术油提取方法优化研究[J]. 园艺与种苗,2020,40(3):23-24,27.

LUO S,ZHAO Q,GUO Y Q,et al. Study on optimization of extraction method of zedoary turmeric oil[J]. Horticulture & Seed,2020,40(3):23-24,27.

[8]李璇,潘婷敏,耿媛霄,等. α-萜品烯酰基农用杀菌活性物的合成及活性研究[J]. 林产化学与工业,2022,42(6):39-46.

LI X,PAN T M,GENG Y X,et al. Synthesis and antifungal/anti-oomycete of turpentine based derivatives[J]. Chemistry and Industry of Forest Products,2022,42(6):39-46.

[9]TAO P,WU C Y,HAO J,et al. Antifungal application of rosin derivatives from renewable pine resin in crop protection[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2020,68(14):4144-4154.

[10]冯雪贞,肖转泉,范国荣,等. 氢化诺卜基双季铵盐的合成及抑菌活性[J]. 生物质化学工程,2021,55(2):45-49.

- FENG X Z, XIAO Z Q, FAN G R, et al. Synthesis and antifungal activity of hydronopyl gemini quaternary ammonium salts[J]. Biomass Chemical Engineering, 2021, 55(2): 45–49.
- [11] HAN X, XU R L, GU S H, et al. Synthesis of acrylopimarinic acid triazole derivatives and their antioomycete activity against *Phytophthora capsici* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(2): 973–982.
- [12] XU R L, CHEN K, HAN X, et al. Design and synthesis of antifungal candidates containing triazole scaffold from natural rosin against *Valsa mali* for crop protection[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(25): 9718–9727.
- [13] 邓丽莉, 潘晓倩, 生吉萍, 等. 考马斯亮蓝法测定苹果组织微量可溶性蛋白含量的条件优化[J]. 食品科学, 2012, 33(24): 185–189.
- DENG L L, PAN X Q, SHENG J P, et al. Optimization of experimental conditions for the determination of water soluble protein in apple pulp using coomassie brilliant blue method[J]. Food Science, 2012, 33(24): 185–189.
- [14] GAO Y Q, XU R L, GU S H, et al. Discovery of natural rosin derivatives containing oxime ester moieties as potential antifungal agents to control tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(18): 5551–5560.
- [15] WU C Y, TAO P, LI J, et al. Antifungal application of pine derived products for sustainable forest resource exploitation[J/OL]. Industrial Crops and Products, 2020, 143: 111892[2024-01-05]. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111892>.
- [16] 丁清颖, 昌家宇, 肖转泉, 等. 含氢化诺卜基的季铵盐化合物的抑菌活性及其机理研究[J]. 林产化学与工业, 2023, 43(4): 25–30.
- DING Q Y, CHANG J Y, XIAO Z Q, et al. The antibacterial activity and mechanism of hydronopyl quaternary ammonium compounds[J]. Chemistry and Industry of Forest Products, 2023, 43(4): 25–30.
- [17] 张森, 檀立, 汪章勋, 等. 丙硫菌唑对水稻纹枯病菌的生物活性研究[J]. 安徽农业大学学报, 2022, 49(5): 700–706.
- ZHANG S, TAN L, WANG Z X, et al. Study on the bioactivity of prothionazole to *Rhizoctonia solani* caused by rice sheath blight[J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2022, 49(5): 700–706.
- [18] 龚岫, 石英, 韩毅强, 等. 提取缓冲液 pH 值对植物组织中 SOD、POD 和 CAT 酶活性的影响[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2017, 29(2): 8–12.
- GONG S, SHI Y, HAN Y Q, et al. Effect of pH of extraction buffer on SOD, POD and CAT in the plant tissue[J]. Journal of Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2017, 29(2): 8–12.
- [19] 姬祥卓, 闫好禄, 唐勋, 等. 马铃薯块茎休眠解除过程中 CAT 酶活性变化及分析[J]. 分子植物育种, 2017, 15(10): 4825–4829.
- JI X Z, YAN H L, TANG X, et al. Changes of CAT enzyme activities during progression of potato tuber dormancy release and its encoded gene bioinformatics analysis[J]. Molecular Plant Breeding, 2017, 15(10): 4825–4829.
- [20] 袁斌, 周诗雨, 刘昌伟, 等. 多酚氧化酶的提取工艺与活性测定研究[J]. 茶叶通讯, 2020, 47(2): 291–296.
- YUAN B, ZHOU S Y, LIU C W, et al. Study on extraction process and activity determination of polyphenol oxidase[J]. Journal of Tea Communication, 2020, 47(2): 291–296.
- [21] 聂小华, 敖宗华, 尹光耀, 等. 提取技术对温莪术挥发油化学成分及其体外抗肿瘤活性的影响[J]. 药物生物技术, 2003, 10(3): 152–154.
- NIE X H, AO Z H, YIN G Y, et al. Effect of extraction techniques on the components and antitumor activity *in vitro* of volatile oil from *Curcuma Wenyujin*[J]. Pharmaceutical Biotechnology, 2003, 10(3): 152–154.
- [22] 魏巍, 王冰瑶. 莪术及其主要成分的药理作用研究进展[J]. 药物评价研究, 2022, 45(10): 2154–2160.
- WEI W, WANG B Y. Research progress on pharmacological effects of *Curcuma rhizoma* and its main chemical compositions[J]. Drug Evaluation Research, 2022, 45(10): 2154–2160.