



詹俊杰,周星海,张晋豪,等.香芹酚/ β -环糊精包合物制备及熏蒸防治白菜根肿病的研究[J].江西农业大学学报,2023,45(3):663-672.

ZHAN J J,ZHOU X H,ZHANG J H,et al.Study on preparation of carvacrol/ β -cyclodextrin inclusion complex and fumigation to control cabbage clubroot[J].Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis,2023,45(3):663-672.

香芹酚/ β -环糊精包合物制备 及熏蒸防治白菜根肿病的研究

詹俊杰¹,周星海^{1*},张晋豪¹,贺赛雅¹,叶敏¹,艾瑛²,姬广海¹,苏发武^{1*}

(1.云南农业大学 省部共建云南生物资源保护与利用国家重点实验室,云南 昆明 650201;2.云南省玉溪市通海县植保植检站,云南 玉溪 652700)

摘要:【目的】为寻找防治十字花科蔬菜根肿病的新药,同时解决香芹酚易挥发难以直接用于田间生产的问题。【方法】通过共沉淀法制备香芹酚/ β -环糊精包合物,利用紫外分光光度计(UV-Vis)、傅里叶红外光谱仪(FTIR)、核磁共振氢谱(¹H NMR)和电子显微镜(SEM)测定香芹酚/ β -环糊精包合物的包封率和表征;采用伊文思蓝染色观察香芹酚处理后根肿病菌孢子的死亡率,结合香芹酚/ β -环糊精包合物熏蒸处理根肿病土的温室盆栽试验,研究香芹酚对根肿病的防效。【结果】香芹酚/ β -环糊精包合物产率为82.6%,包封率为53%,傅里叶红外光谱和核磁共振氢谱证实香芹酚/ β -环糊精包合物的形成,SEM下能够观察到规律、大小均匀的香芹酚/ β -环糊精包合物颗粒;香芹酚稀释1 000倍处理根肿病菌孢子5 d后,根肿病菌的孢子平均致死率为43.33%,比1%甲醇、无菌水处理的根肿病菌孢子平均致死率提高了29.88%和31.66%;在香芹酚的包合物覆膜熏蒸病土的2次温室盆栽试验中,T₁处理白菜根肿病发病率和病情指数分别为60%和12.59,CK₁白菜根肿病发病率和病情指数分别为100%和39.26;T₂处理白菜根肿病发病率和病情指数分别为73.33%和24.44,CK₂白菜根肿病发病率和病情指数分别为100%和51.11,相对防效分别为67.93%和52.18%。【结论】香芹酚对根肿病菌孢子有直接致死作用,香芹酚/ β -环糊精包合物熏蒸处理对根肿病有较好的防效,可以为后续的大田试验和根肿病新药研制提供理论基础。

关键词:白菜根肿病;熏蒸;香芹酚/ β -环糊精包合物

中图分类号:S436.341.1⁹;S482.1 文献标志码:A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

文章编号:1000-2286(2023)03-0663-10



Study on Preparation of Carvacrol/ β -Cyclodextrin Inclusion Complex and Fumigation to Control Cabbage Clubroot

ZHAN Junjie¹,ZHOU Xinghai^{1*},ZHANG Jinhao¹,HE Saiya¹,
YE Min¹,AI Ying²,JI Guanghai¹,SU Fawu^{1*}

(1.The State Key Laboratory for Protection and Utilization of Biological Resources in Yunnan Province, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2.Tonghai Plant Protection and Plant Quarantine Station, Yuxi, Yunan 652700, China)

收稿日期:2022-11-15 修回日期:2023-01-11

基金项目:国家重点研发计划项目(2019YFD1002000)和云南省科技厅科技计划项目(202101AT070262)

Project supported by the National Key R&D Program of China(2019YFD1002000)and Science and Technology Planning Project of Jiangxi Provincial Department of Education(202101AT070262)

作者简介:詹俊杰,硕士生,orcid.org/0000-0001-5562-7634,1012460800@qq.com; * 为共同第一作者; *通信作者:苏发武,博士,主要从事农药活性成分的发现及修饰合成研究,orcid.org/0000-0002-6230-3029,su_fawu@126.com.

Abstract: [Objective] This study aims to find a new drug for the prevention and treatment of clubroot of cruciferous vegetables, thus solving the problem that carvacrol is volatile and difficult to be directly used in field production. [Method] In this study, Carvacrol/ β -cyclodextrin inclusion complex was prepared by coprecipitation method, uv-vis, Fourier photometer, ^1H NMR and SEM were used to determine the entrapment efficiency and characterization of carvacrol β -cyclodextrin inclusion Proton NMR. The effect of carvacrol on the control of clubroot disease was studied by observing the mortality of spores of clubroot fungus treated with carvacrol by Evans blue staining and greenhouse pot experiment of treating clubroot soil with carvacrol- β -cyclodextrin inclusion complex fumigation. [Result] The yield of Carvacrol/ β -cyclodextrin inclusion complex was 82.6%, and the encapsulation efficiency was 53%. FTIR confirmed the formation of Carvacrol/ β -cyclodextrin inclusion complex, and regular and uniform Carvacrol/ β -cyclodextrin inclusion complex particles could be observed under SEM; After carvacrol was diluted 1 000 times and treated for 5 days, the average lethality of clubroots was 43.33%, which was 29.88% and 31.66% higher than that treated with 1% methanol and sterile water; In two greenhouse pot experiments of fumigating diseased soil with the inclusion compound of Carvacrol/ β -cyclodextrin, the incidence and disease index of cabbage clubroot were 60% and 12.59 in T1 treatment, those of CK1 cabbage were 100% and 39.26; and those of T2 treatment of Chinese cabbage clubroot were 73.33% and 24.44, respectively, those of CK2 were 100% and 51.11, and the relative control effects were 67.93% and 52.18%, respectively. [Conclusion] Carvacrol has a direct lethal effect on clubroot, and fumigation of carvacrol/ β -cyclodextrin inclusion complex has a good control effect on clubroot, which can be used for subsequent field experiments and provides a theoretical basis for the development of new drugs for clubroot disease.

Keywords: clubroot disease of cabbage; fumigation; Carvacrol/ β -cyclodextrin inclusion complex

【研究意义】十字花科作物根肿病是由芸薹根肿菌(*Plasmodiophora brassicae*)侵染引起的世界性土传病害,对白菜、油菜、甘蓝等近百种十字花科作物的生产造成严重威胁,近年来在我国华东、华北、华中和西南等蔬菜产区根肿病发病日益严重^[1-3]。【前人研究进展】根肿病菌休眠孢子能在土壤中存活10年以上,并在适宜的条件下侵染寄主根系,在根部形成大小不一的瘤状物,阻碍了水分和营养物质的运输,严重影响了寄主的生长发育,甚至导致寄主死亡,进而绝收^[4-6]。化学农药作为防治根肿病的重要手段之一,其中氟啶胺和氰霜唑对根肿病的防效最显著,李妍等^[7]通过温室试验和田间验证发现氟啶胺对白菜根肿病的防效都超过80%,陈秀等^[8]用氟啶胺和氰霜唑田间防治甘蓝根肿病发现,2种农药防效都在60%左右,Liao等^[9]试验结果表明氟啶胺与甲霜灵-锰锌、多菌灵相比依然是防治根肿病最好的农药,防效为59.81%,氟啶胺和氰霜唑出现防效不稳定且有下降的趋势,同时郭成根等^[10]发现越早施用氰霜唑对青花菜根肿病防效越好,最高能达到69.40%。单一化学农药的长期大量使用不仅增强根肿病菌的抗药性,降低药效,同时造成了各种环境问题并严重威胁着食品安全,因此找到环境友好型且对根肿病有良好防效的新型农药是必要的。【本研究切入点】近年来,香芹酚因其抗菌活性强和对环境友好而广受关注,香芹酚(carvacrol, CV)是一种单萜酚,化学名:2-甲基-5-异丙基苯酚,不溶于水,易溶于有机溶剂,多存在于牛至精油、百里香精油中,是一种天然的杀菌化合物^[11],Ben等^[12]研究表明香芹酚的挥发气体对荧光假单胞菌、灰霉病菌、酵母菌、大肠杆菌等微生物都有明显抑菌效果,是一种抗菌效果极好的天然熏蒸剂;但香芹酚在空气、光、湿度和高温下的挥发性和快速降解限制了它在农业上的应用^[13],环糊精由于其保护装载在内的生物活性化合物不会直接接触恶劣环境条件的特性,在制药和农业等多方面都引起了人们的极大关注^[14]。环糊精具有亲水表面和疏水内部环境^[15],环糊精的疏水内部能够和具有疏水性质的有机物、无机物、大分子化合物等物质进行非共价性结合,Wang等^[16]采用饱和水溶液法制备了 β -环糊精/山苍子挥发油包合物并证实了能够对柑橘青霉、指状青霉等真菌的生长起到明显抑制作用,Gao等^[17]采用共沉淀法制成了氰草津/ β -

环糊精包合物并进行田间试验证实了氰草津/ β -环糊精包合物具有良好除草效果,以上研究都表明 β -环糊精可作为多种农药良好的包埋材料。因此本研究提出了利用 β -环糊精包埋香芹酚的方法,不仅提高了香芹酚的稳定性,还可以令香芹酚从 β -环糊精中持续挥发,达到抑菌持久性、提高水溶性,降低香芹酚挥发和延长半衰期;同时通过温室盆栽试验,用香芹酚/ β -环糊精包合物熏蒸根肿病病土,评价香芹酚/ β -环糊精包合物对白菜根肿病的温室防治效果。【拟解决的关键问题】用 β -环糊精包埋处理香芹酚,降低其挥发性和提高可使用性,并用改良后的香芹酚/ β -环糊精包合物熏蒸处理根肿病土,探究香芹酚/ β -环糊精包合物对白菜根肿病的防治效果,为易挥发难应用的天然化合物和根肿病防治新型农药提供参考借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料 香芹酚(萨恩化学技术有限公司)、 β -环糊精(萨恩化学技术有限公司),感病白菜品种83-1(鲁春白1号,青岛国际种苗有限公司)。

1.1.2 主要实验仪器 电子天平、紫外分光光度计、金属浴恒温磁力搅拌器、扫描电镜、傅里叶红外变化仪、光学显微镜。

1.1.3 试验地点 云南农业大学植物保护学院温室。

1.2 试验方法

1.2.1 香芹酚/ β -CD包合物的制备 在55℃下,将 β -CD溶解于60 mL水溶液中,直至 β -CD水溶液完全澄清,加入与 β -CD摩尔比为1:1的香芹酚,之后大力搅拌反应混合物,将溶液保持在55℃下持续搅拌约4 h,停止加热,继续搅拌4 h,直至温度降至室温,放入4℃冰箱保持24 h,取出络合物通过真空抽滤回收沉淀包合物,放入60℃烘箱中,完全去除水分,直至获得恒定干重的包合物颗粒。

1.2.2 香芹酚标准曲线图制备 香芹酚的无水乙醇溶液通过紫外分光光度计测定发现在275 nm处有明显吸收峰。精确配制0.25, 0.2, 0.15, 0.1, 0.05 $\mu\text{L/mL}$ 5个浓度的香芹酚无水乙醇标准溶液,利用紫外分光光度计测定5个浓度对应的吸光度制备香芹酚标准曲线图^[18](每个浓度重复3次,结果取平均值),用于后续计算香芹酚/ β -CD的包封率。

1.2.3 香芹酚/ β -CD包封率的测定 为测定包合物包封率,将质量40 mg的香芹酚/ β -CD包合物放入圆底烧瓶中,加入25 mL无水乙醇,将圆底烧瓶密封,搅拌150 min,移取5 mL提取液用Phenex RC 0.45 μL 注射过滤器获取滤液,利用紫外分光光度计测定溶液吸光度^[19],通过香芹酚标准曲线确定包合物中香芹酚含量。公式计算香芹酚/ β -CD包封率和产率:

$$\text{包封率} = \frac{\text{实际香芹酚质量}}{\text{理论香芹酚质量}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{产率} = \frac{\text{实际包合物质量}}{\text{理论包合物质量}} \times 100\% \quad (2)$$

1.2.4 傅里叶红外光谱(FTIR)测定 称取与溴化钾粉末1:120比例的样品粉末混合研磨,将粉末进行压片处理,制成样品圆片放入傅里叶变换红外光谱仪中进行透射率测定,实验对香芹酚/ β -CD包合物粉末、香芹酚、 β -CD 3种样品在扫描范围为400~4 000 cm^{-1} 进行红外光谱测定,后续进行红外光谱分析。

1.2.5 核磁共振氢谱(^1H NMR) 核磁共振氢谱(^1H NMR)主要进行对含有芳香环的化合物进行检测,根据谱图的化学位移变化以及新峰的出现都能够有效证实主客体之间的互动, ^1H NMR是证明香芹酚包埋入 β -环糊精中最有力的证据,将香芹酚用MeOD溶解, β -环糊精和包合物用 D_2O 溶解,在频率为400 MHz的室温下扫描测得结果。

1.2.6 扫描电子显微镜(SEM)观察 用扫描电子显微镜观察了不同样品包括 β -CD、香芹酚/ β -CD包合物的表面形态结构,使用电导胶粘取部分样品在样品台上,进行扫描电镜测定。

1.2.7 伊文思蓝染色观察香芹酚对根肿病菌孢子的致死作用 取新鲜的白菜根肿组织,用破壁机将其

打成匀浆,加水经过4层纱布过滤收集滤液,取30 mL的根肿病菌孢子滤液于50 mL离心管中,500 r/min离心5 min,取上清液,转入新的灭菌50 mL离心管中,4 000 r/min离心10 min,去上清液,向沉淀中加入5 mL的50%蔗糖溶液振荡混匀,2 000 rpm离心10 min,吸取上清液转入新的灭菌50 mL离心管中,加30 mL无菌水,4 000 r/min离心10 min收集沉淀,用25 mL无菌水悬浮沉淀4 000 r/min,离心10 min,重复3次,最后收集沉淀用无菌水配制成浓度为 1×10^8 cfu/ml的根肿病菌孢子悬浮液,放置于4 ℃冰箱备用。

用甲醇溶解香芹酚,设3个处理,a:相同条件下无菌水中的根肿病菌孢子,b:配制浓度1%的甲醇与根肿病菌孢子共置5 d,c:配制浓度为1‰香芹酚与根肿病菌孢子共置5 d后。5 d后离心收集根肿病菌孢子,并参照Harding等^[20]的方法用伊文思蓝染色观察,并用下面公式对根肿病菌孢子死亡率进行统计。

$$\text{根肿病菌孢子死亡率} = \frac{\text{视野中深蓝色孢子数}}{\text{视野中深蓝色孢子数} + \text{视野中透亮孢子数}} \times 100\%$$

(3)

1.2.8 香芹酚/ β -环糊精包合物覆膜熏蒸对白菜根肿病的温室防效试验 温室盆栽试验在云南农业大学植物保护学院温室中分别于2021年9—11月和2022年3—5月进行了2次,对2次试验进行编号(表1),T₁:第一次试验中称量根肿病土质量1‰的香芹酚/ β -环糊精包合物与根肿病土搅拌均匀后覆膜熏蒸5 d,CK₁:第一次试验的仅覆膜对照;T₂:第二次试验中称量根肿病土质量1‰的香芹酚/ β -环糊精包合物与根肿病土搅拌均匀后覆膜熏蒸5 d,CK₂:第二次试验的仅覆膜对照。将香芹酚/ β -环糊精包合物与根肿病土混合均匀装盆后,立即用0.08 mm厚的地膜把花盆密封住,在温室中不同温度熏蒸5 d,2次熏蒸过程中的温度分别为35 ℃和22 ℃,熏蒸5 d后揭膜并播种白菜种子,每盆播种15粒种子,间苗后每盆留下5棵白菜,每个处理3个生物学重复,播种后60 d进行调查。试验中用到的根肿病土来自云南省昆明市盘龙区白菜根肿病重病田,发病率100%,病情指数为77.43。

表 1 温室试验设计

Tab.1 Greenhouse experiment design

编号 Number	处理 Treatment	用量 Dosage	覆膜熏蒸时间/d Cover film fumigation time	熏蒸环境温度/℃ Fumigation ambient temperature
T ₁	香芹酚/ β -环糊精包合物熏蒸	1:1 000	5	35
CK ₁	仅覆膜	/	5	35
T ₂	香芹酚/ β -环糊精包合物熏蒸	1:1 000	5	22
CK ₂	仅覆膜	/	5	22

用量是香芹酚/ β -环糊精包合物与土壤的质量比。
The dosage is the mass ratio of Carvacrol/ β -Cyclodextrin inclusion complex to soil.

1.2.9 防效测定 白菜播种60 d后调查根肿病的发病情况,参照表2分级标准^[21]结合以下公式计算发病率、病情指数和相对防效。

表 2 白菜根肿病病情分级标准

Tab.2 Chinese cabbage clubroot disease condition classification standard

病情等级 Disease grade	描述 Describe	病情等级 Disease grade	描述 Describe
0	根部无肿瘤(包括主根和侧根)	5	主根肿大直径小于茎基部的3倍,侧根发生肿大数量占50%~70%的根系
1	仅在侧根肿大	7	主根肿大,直径是茎基部的3~4倍或侧根发生肿大数量大于70%的根系
3	主根肿大直径小于茎基部的2倍,侧根发生肿大数量小于50%	9	主根肿大,直径大于茎基部的4倍

发病率 = $\frac{\text{发病株数}}{\text{调查株数}} \times 100\%$ (4)

病情指数 = $\frac{\sum(\text{发病株数} \times \text{对应病情等级})}{\text{总株数} \times \text{最高病情等级}} \times 100\%$ (5)

相对防效 = $\frac{\text{对照病情指数} - \text{处理病情指数}}{\text{对照病情指数}} \times 100\%$ (6)

2 结果与分析

2.1 香芹酚/ β -CD 包合物包封率测定

香芹酚标准曲线如图 1 所示,利用标准曲线图($y=7.662x+0.613\ 5$, $R^2=0.911\ 3$)在 275 nm 波长处用 UV-Vis 光谱分析计算包封率,根据 1.2.3 所述方程计算香芹酚/ β -CD 包合物包封率为 53%,产率为 82.6%。

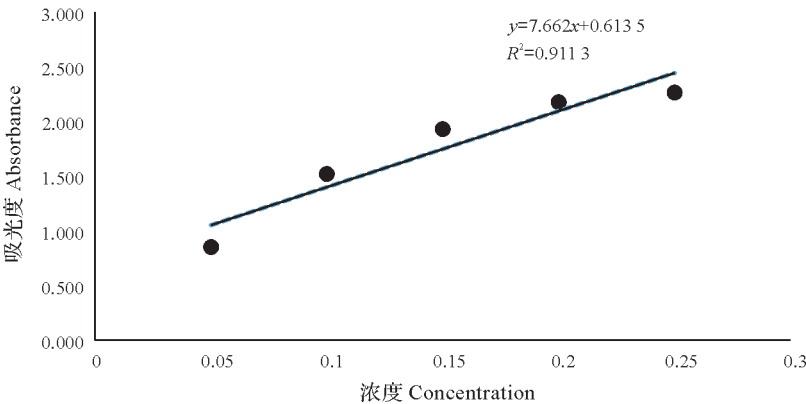
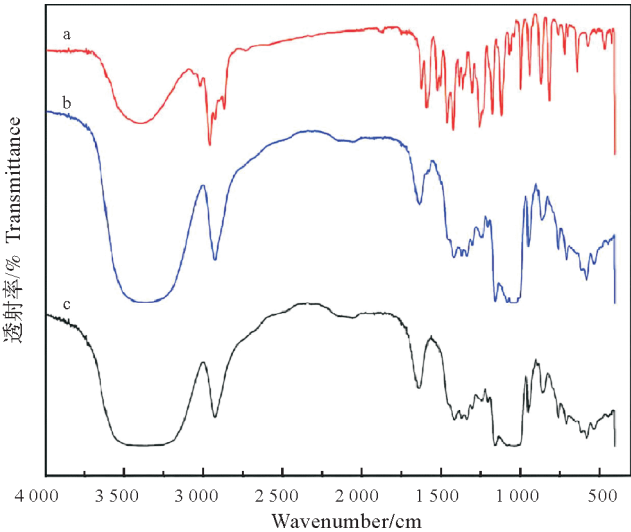


图 1 香芹酚标准曲线

Fig.1 Standard curve of carvacrol

2.2 香芹酚/ β -CD 包合物傅里叶红外光谱测定 (FTIR)

FTIR 分析可以探索主体分子和客体分子之间存在的相互作用。根据被测样品红外光谱中吸收峰的形状、位置和强度,可以得到该物质官能团的重要信息,如图 2 所示 a 为香芹酚红外光谱图,3 200~3 680 cm^{-1} 为 OH 基团的吸收峰,1 621 cm^{-1} 、1 589 cm^{-1} 处都是苯环的特征峰,1 382 cm^{-1} 和 1 365 cm^{-1} 2 个相近的吸收峰是异丙基的特征峰, b 为香芹酚/ β -CD 包合物颗粒红外光谱图,在 3 000~3 680 cm^{-1} 是 OH 基团的吸收峰,2 927 cm^{-1} 为 C-H 伸缩振动,1 030 cm^{-1} 为 C-O-C 伸缩振动,1 154 cm^{-1} 为 C-O 伸缩振动,与 c 的 β -CD 颗粒红外光谱图极其相似,这是因为 β -CD 的含量远高于香芹酚,香芹酚的红外吸收峰被遮盖,另一方面,香芹酚/ β -CD 包合物颗粒与 β -CD 颗粒的红外光谱图相比,1 154.85 cm^{-1} 处的谱带略微移动到了 1 157.71 cm^{-1} 处,并且 OH 基团的出峰位置也比 CD 更向低波数处位移,这是香芹酚的 OH 基团与 β -CD 的 C-O-C 基团相互作用的结果,最终证实了香芹酚/ β -CD 包合物的形成。



a: 环糊精; b: 香芹酚; c: 香芹酚/ β -环糊精包合物。
a: β -cyclodextrin; b: Carvacrol; c: Carvacrol/ β -cyclodextrin inclusion complex.

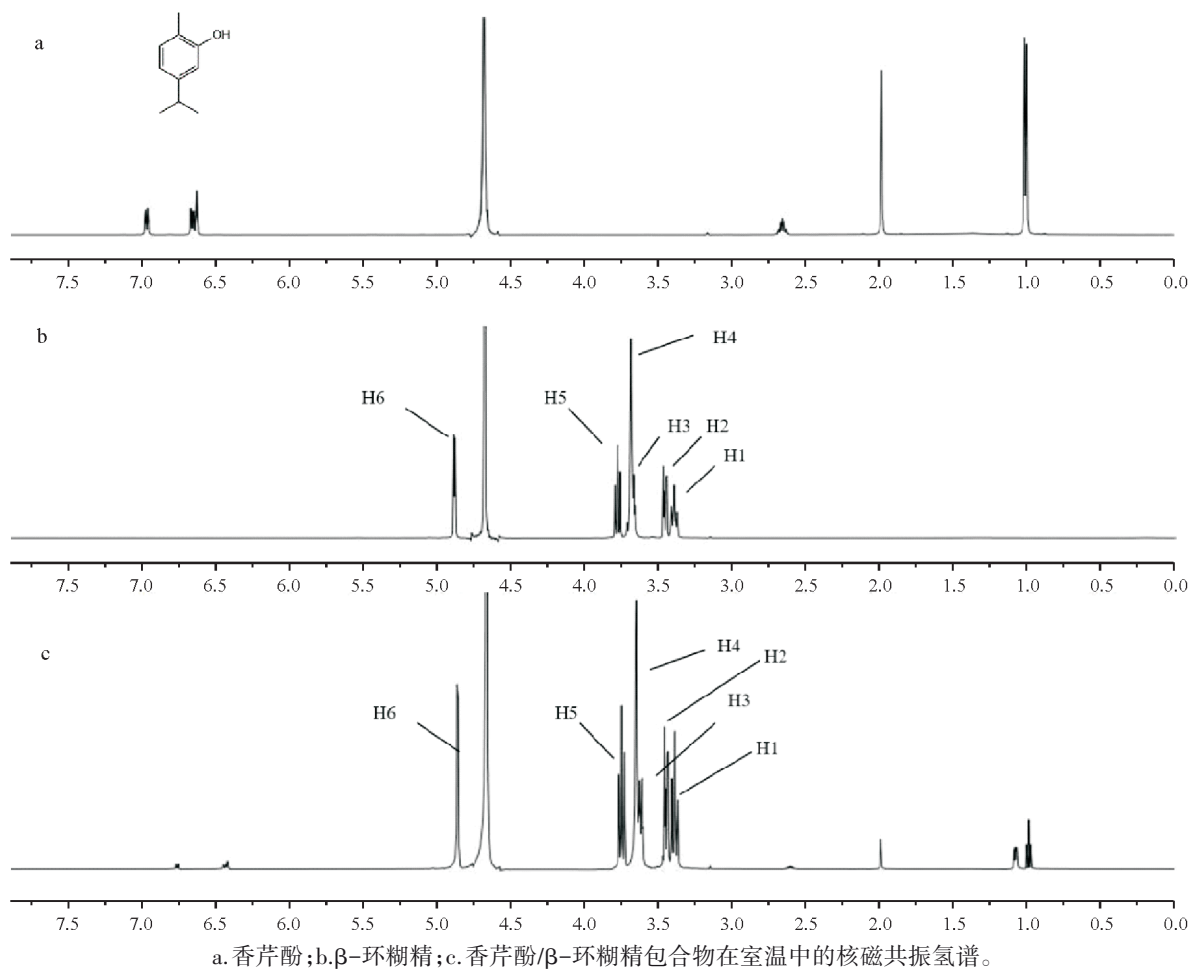
图 2 3 种样品的红外光谱差异

Fig.2 Differences in infrared spectra of three samples

2.3 核磁共振氢谱 (1H NMR)

香芹酚、 β -环糊精、包合物的 ^1H NMR 如图 3 所示,包合物的 ^1H NMR 出现了香芹酚的特征峰,并且因为香芹酚的影响,在 β -环糊精内部的 H3 和 H5 发生了化学位移值, H3 从 3.663 位移到了 3.616,化学位移

值为 -0.047 , H5从 3.771 位移到了 3.739 , 化学位移值为 -0.032 , H3的化学位移值比H5高, 并且H3靠近空腔的宽口端, H5靠近空腔的窄口端, 证明香芹酚成功包埋进入 β -环糊精中, 并且可以推断是从靠近H3的宽口端进入 β -环糊精的空腔中^[22]。



a. Carvacrol; b. β -cyclodextrin; c. Nuclear magnetic resonance spectroscopy of carvacrol/ β -cyclodextrin inclusion complex at room temperature.

图3 3种材料的核磁共振氢谱对比

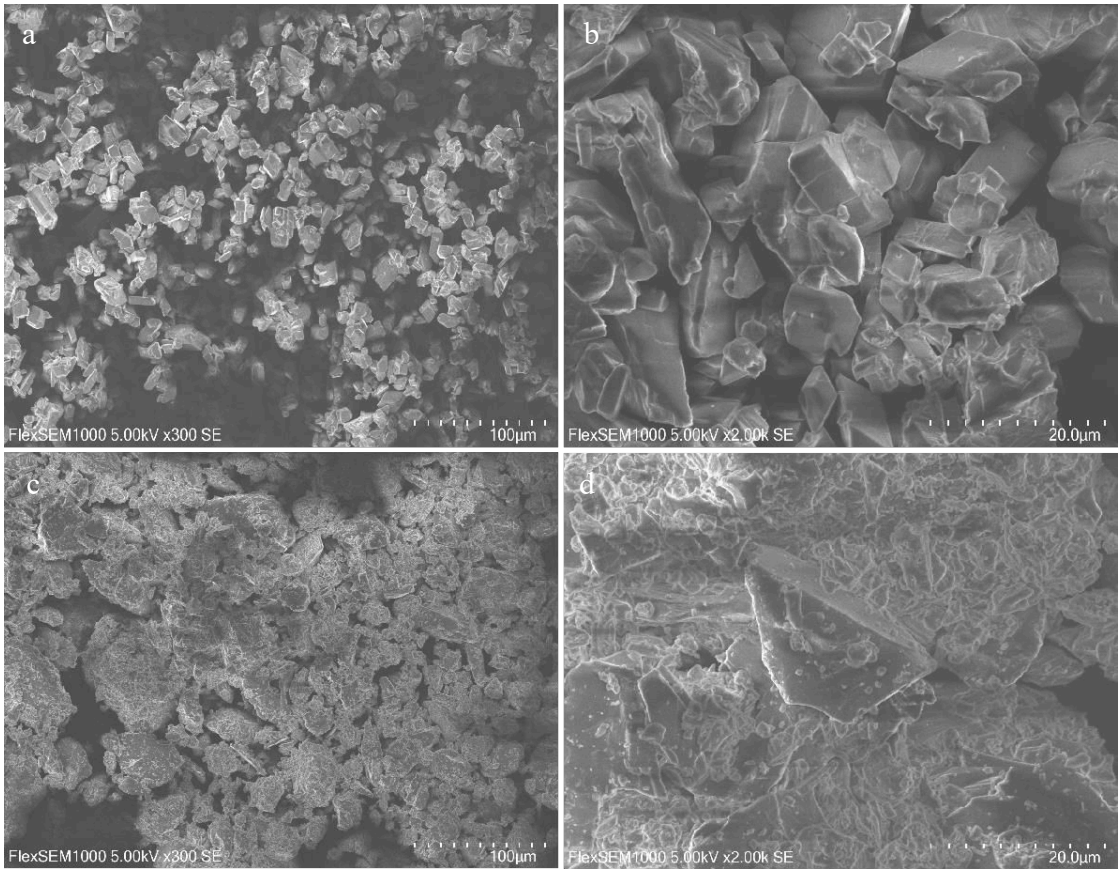
Fig.3 Comparison of NMR hydrogen spectra of three materials

2.4 扫描电镜(SEM)观察结果

电子扫描电镜可以更加直观反映包合物形成, 通过直接对包合物颗粒外观的观察, 分析可能的形态结构的变化, 图4a和4b是香芹酚/ β -CD包合物在扫描电镜300倍和2000倍下的图像, 可以观察到更小的、形状有序的晶体颗粒, 并且颗粒尺寸趋于均匀, 明显表现出更强的聚集, (c)和(d)是 β -CD扫描电镜300倍和2000倍下的图像, 可以观察到块状、不规则的晶体形状, 颗粒较大, 结构较致密, 表面上还附着一些晶体颗粒。上述形态的明显变化表明, 由于香芹酚进入 β -CD空腔中, 导致 β -CD形态发生了显著的变化, 形成了香芹酚/ β -CD包合物颗粒。

2.5 香芹酚对根肿病菌孢子的致死效果

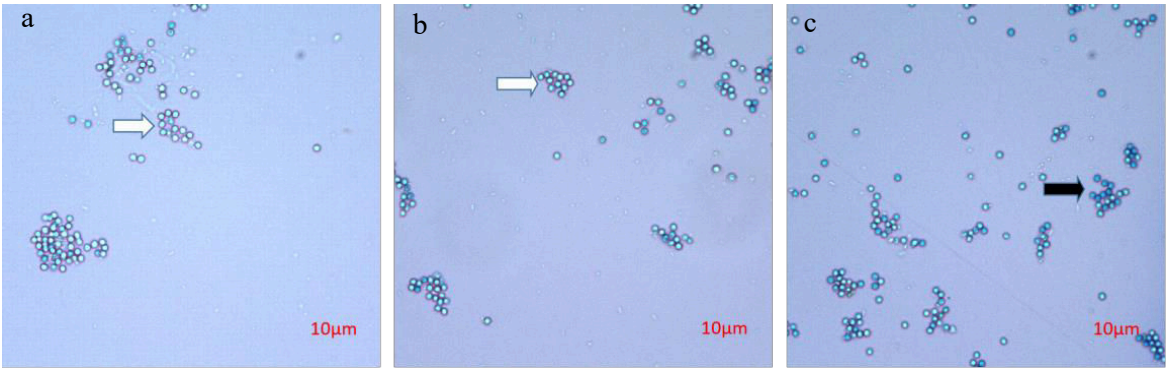
利用伊文思蓝对处理后的根肿病菌孢子染色如图5所示, a: 根肿病菌孢子在无菌水中的死亡率为11.67%, b: 1%甲醇处理根肿病菌孢子5 d后孢子死亡率为13.45%, c: 用甲醇溶解香芹酚并稀释1000倍处理根肿病菌孢子5 d能有效杀死根肿病菌孢子, 对根肿病菌孢子的平均致死率为43.33%。在3种不同处理条件下, 根肿病菌孢子的死亡率处理c>处理b>处理a, 且处理c对根肿病菌孢子的死亡率显著高于处理a和处理b, 处理a和处理b根肿病菌孢子死亡率差异不显著, 处理c比处理a和处理b的根肿病菌孢子死亡率分别提高了31.66%和29.88%。



a 和 b 为香芹酚/ β -CD 包合物颗粒 300 倍、2 000 倍 SEM 图;c 和 d 为 β -CD 颗粒 300 倍、2 000 倍 SEM 图。
a and b are SEM images of carvacrol/ β -CD inclusion complex particles at 300 times and 2 000 times;
c and d are SEM images of β -CD particles at 300 times and 2 000 times.

图 4 2 种样品的 SEM 比较

Fig.4 SEM comparison of the two samples



视野中深蓝色孢子为死孢子,视野中透亮孢子为活孢子。

The dark blue spores in the field of view are dead spores, and the translucent spores in the field of view are live spores.

图 5 伊文思蓝染色观察香芹酚对根肿病菌孢子的致死作用

Fig.5 Evans blue staining to observe the lethal effect of carvacrol on club spores

2.6 香芹酚/ β -环糊精包合物覆膜熏蒸对白菜根肿病温室防效

2次香芹酚/ β -环糊精包合物的温室熏蒸试验对白菜根肿病的防效都在 50% 以上(图 6), T_1 处理白菜根肿病发病率和病情指数分别为 60% 和 12.59, CK_1 白菜根肿病发病率和病情指数分别为 100% 和 39.26; T_2 处理白菜根肿病发病率和病情指数分别为 73.33% 和 24.44, CK_2 白菜根肿病发病率和病情指数分别为 100% 和 51.11。 T_1 和 T_2 的相对防效分别为 67.93% 和 52.18%。同时熏蒸过程中提高温度也会降低白菜根肿病的发病率和病情指数,提高香芹酚/ β -环糊精包合物对根肿病的防治效果。



a图:第一次试验对照(CK₁);b图:第一次试验处理(T₁);c图:第二次试验对照(CK₂);d图:第二次试验处理(T₂)。

Picture a: the first test control (CK₁); picture b: the first test treatment (T₁); picture c: the second test control (CK₂); picture d: the second test treatment (T₂).

图6 香芹酚/ β -环糊精包合物覆膜熏蒸处理对白菜根肿病的防治效果

Fig.6 Control effect of carvacrol inclusion compound film-covered fumigation on Chinese cabbage clubroot

3 讨论

香芹酚是一种从植物中提取的天然化合物,已被证实对许多病原真菌和细菌都有抑制效果^[23],已有研究表明香芹酚对灰葡萄孢菌^[24],指状青霉^[25]等病原真菌的生长和繁殖都有强烈的熏蒸抑制作用。虽然香芹酚的熏蒸抑菌效果已被证实,但目前香芹酚针对十字花科蔬菜根肿病的防治暂时未见相关文献报道,本试验通过香芹酚处理根肿病菌孢子和香芹酚/ β -环糊精包合物熏蒸根肿病土的温室盆栽试验,结果表明香芹酚对根肿病菌孢子有一定的致死作用,香芹酚/ β -环糊精包合物熏蒸处理对白菜根肿病有较好的防治效果。

香芹酚虽然对病原真菌熏蒸抑制效果良好,但由于香芹酚挥发性强、水溶性差的缺点,在生产上的应用较少,为了提高香芹酚的可使用性。本研究通过以 β -环糊精为缓释材料共沉淀法制备香芹酚/ β -环糊精包合物可以降低香芹酚的挥发,增强其水溶性,与Rakmai等^[26]的研究结果一致。因此共沉淀法能有效地解决易挥发、难溶于水的植物源精油难于在生产上应用困难的问题。

目前,香芹酚作为客体进入包埋材料和利用环糊精包埋天然化合物的报道较少,但是将不同天然化合物包埋入其他缓释材料的可行性越来越得以证实,Ziaee等^[27]通过将天然化合物肉豆蔻酸包埋入壳聚糖中制成纳米凝胶并进行熏蒸杀灭仓储害虫试验;De等^[28]通过将香芹酚与壳聚糖不同配比溶液覆盖樱桃番茄表面抑制黄曲霉菌菌丝生长和分生孢子萌发,Ge等^[29]制备了多菌灵/羟丙基-环糊精(Hp-CD)包合物提高多菌灵包合物对绿色木霉的抑菌活性,上述实验都表明了包埋材料和客体分子可以进行一定程度上的选择更替,但包合物制备的操作方法、主客体分子的比例还需要进一步的深入研究确定。

本文进行了2次温室盆栽试验,T₁第一次试验熏蒸过程中的环境平均温度为35℃,T₂第二次试验熏蒸过程中的环境平均温度为22℃,T₁和T₂的相对防效分别为67.93%和52.18%,T₁处理的相对防效比T₂的高出15.81%。因此笔者推测提高熏蒸过程中的温度,可能会提高香芹酚/ β -环糊精包合物对白菜根肿病的防治效果。刘琛^[30]用西兰花熏蒸对烟草青枯病有较好的防治效果,并且防效随着温度升高而提高,熏蒸温度从14℃上升到26℃时,抑菌率从75%上升到92%,当熏蒸温度为32℃,抑菌率为95.1%时

熏蒸效果最好;王惟萍等^[31]发现威百亩对黄瓜枯萎病的防治效果随着土壤温度的升高而增强,在25℃、30℃和35℃时的防效分别为80.18%、98.20%和100.00%,刘国军^[32]研究发现香芹酮在不同温度条件下熏蒸活性也存在差异,在20℃和25℃熏蒸活性较好,但30℃时熏蒸活性相对较差。因此提高熏蒸温度是否能提高香芹酚/ β -环糊精包合物对白菜根肿病的防效还需要进一步研究。

4 结 论

本研究证实香芹酚对根肿菌休眠孢子有直接的致死作用,温室盆栽试验中用香芹酚/ β -环糊精包合物熏蒸根肿病土能有效防治白菜根肿病。本文通过 β -环糊精包裹香芹酚制成粉剂,降低了其强挥发性,达到了缓释的效果,增加了香芹酚的可使用性。香芹酚作为植物源农药,在生产中与化学农药相比有着更高的生态安全性和可持续性的发展前景。

参考文献 References:

- [1] 司军,李成琼,任雪松,等.十字花科植物根肿病及抗根肿病育种研究进展[J].西南农业学报,2002(2):69-72.
SI J, LI C Q, REN X S, et al. Research progress on clubroot disease and breeding for clubroot resistance of crucifer [J]. Journal of southwest agriculture, 2002(2):69-72.
- [2] 王靖,黄云,李小兰,等.十字花科根肿病研究进展[J].植物保护,2011,37(6):153-158.
WANG J, HUANG Y, LI X L, et al. Research progress in clubroot of crucifers [J]. Plant protection, 2011, 37(6):153-158.
- [3] 龙同,张亚妮,杨妮娜,等.大白菜根肿病生物防治研究进展[J].湖北农业科学,2019,58(5):5-8.
LONG T, ZHANG Y N, YANG N N, et al. Progress in biological control of Chinese cabbage clubroot disease [J]. Hubei agricultural sciences, 2019, 58(5):5-8.
- [4] KAGEYAMA K, ASANO T. Life cycle of *Plasmodiophora brassicae* [J]. Journal of plant growth regulation, 2009, 28(3):203-211.
- [5] 白亭亭,杨佩文,李向东,等.不同措施对十字花科作物根肿病控制效果研究[J].西南农业学报,2018,31(4):731-735.
BAI T T, YANG P W, LI X D, et al. Controlling effects of different measures against clubroot of crucifer crops [J]. Southwest China journal of agricultural sciences, 2018, 31(4):731-735.
- [6] 罗茜,程维舜,陈钢,等.土壤环境因素对十字花科根肿病发生的影响研究现状[J].长江蔬菜,2021(16):56-59.
LUO Q, CHENG W S, CHEN G, et al. Research status of the effect of soil environmental factors on the occurrence of clubroot disease in Cruciferae [J]. Journal of Changjiang vegetables, 2021(16):56-59.
- [7] 李妍,谢学文,石延霞,等.防治白菜根肿病的药剂筛选[J].农药学学报,2010,12(1):93-96.
LI Y, XIE X W, SHI Y X, et al. Studies of controlling clubroot of chinese cabbage [J]. Journal of pesticide science, 2010, 12(1):93-96.
- [8] 陈秀,张颂函,张正炜,等.4种杀菌剂不同处理模式防治甘蓝根肿病田间药效评价[J].农药科学与管理,2018,39(4):51-54.
CHEN X, ZHANG S H, ZHANG Z W, et al. Study on field efficacy of four fungicides against cabbage clubroot under different treatment modes [J]. Pesticide science and administration, 2018, 39(4):51-54.
- [9] LIAO J, LUO L, ZHANG L, et al. Comparison of the effects of three fungicides on clubroot disease of tumorous stem mustard and soil bacterial community [J]. Journal of soils and sediments, 2022, 22(1):256-271.
- [10] 郭成根,周晓肖,李伟龙.氰霜唑对青花菜根肿病的田间防效研究[J].湖南农业科学,2019(5):77-80.
GUO C G, ZHOU X X, LI W L. Study on the field control effect of cyazofamid on broccoli clubroot [J]. Hunan agricultural sciences, 2019(5):77-80.
- [11] NOSTRO A, PAPALIA T. Antimicrobial activity of carvacrol: current progress and future perspectives [J]. Recent patents on anti-infective drug discovery, 2012, 7(1):28-35.
- [12] BEN ARFA A, COMBES S, PREZIOSI-BELLOY L, et al. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure [J]. Letters in applied microbiology, 2006, 43(2):149-154.
- [13] AHMADI Z, SABER M, AKBARI A, et al. Encapsulation of *Satureja hortensis* L. (*Lamiaceae*) in chitosan/TPP nanoparticles with enhanced acaricide activity against *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) [J]. Ecotoxicology and environ-

- mental safety, 2018, 161: 111-119.
- [14] KEAWCHAOON L, YOKSAN R. Preparation, characterization and in vitro release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles[J]. Colloids and surfaces B: biointerfaces, 2011, 84(1): 163-171.
- [15] HARADA A. Cyclodextrin-based molecular machines[J]. Accounts of chemical research, 2001, 34(6): 456-464.
- [16] WANG Y, YIN C, CHENG X, et al. β -Cyclodextrin inclusion complex containing *Litsea cubeba* essential oil: preparation, optimization, physicochemical, and antifungal characterization[J]. Coatings, 2020, 10(9): 850.
- [17] GAO S, JIANG J, LI X, et al. Enhanced physicochemical properties and herbicidal activity of an environment-friendly clathrate formed by β -cyclodextrin and herbicide cyanazine[J]. Journal of molecular liquids, 2020, 305: 112858.
- [18] 刘颖蕾. 含香芹酚/ β -环糊精包合物的明胶膜的制备及性能研究[D]. 长春: 吉林大学, 2019.
- LIU Y L. Preparation and characterization of gelatin film incorporated with β -Cyclodextrin-carvacrol inclusion complexes [D]. Changchun: Jilin University, 2019.
- [19] KOTRONIA M, KAVETSOU E, LOUPASSAKI S, et al. Encapsulation of oregano (*Origanum onites* L.) essential oil in β -cyclodextrin (β -CD): Synthesis and characterization of the inclusion complexes[J]. Bioengineering, 2017, 4(3): 74.
- [20] HARDING M W. An improved evans blue staining method for consistent, accurate assessment of *Plasmodiophora brassicae* resting spore viability[J]. Plant disease, 2019, 103(9): 2330-2336.
- [21] 魏兰芳, 张荣琴, 姚博, 等. 大豆轮作及秸秆还田模式对白菜根肿病的影响[J]. 江西农业大学学报, 2021, 43(1): 52-62.
- WEI L F, ZHANG R Q, YAO B, et al. Effect of rotating soybean and its straw returning on chinese cabbage clubroot disease [J]. Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis, 2021, 43(1): 52-62.
- [22] 于迟. 环糊精对几种农药分子包合作用的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2015.
- YU C. Study on inclusion complexes of cyclodextrins with several pesticide molecules [D]. Beijing: China Agricultural University, 2015.
- [23] LIU Q, QIAO K, ZHANG S. Potential of a small molecule carvacrol in management of vegetable diseases [J]. Molecules, 2019, 24(10): 1932.
- [24] ZHAO Y, YANG Y H, YE M, et al. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Origanum vulgare* against *Botrytis cinerea* [J]. Food chemistry, 2021, 365: 130506.
- [25] YANG R, MIAO J, SHEN Y, et al. Antifungal effect of cinnamaldehyde, eugenol and carvacrol nanoemulsion against *Penicillium digitatum* and application in postharvest preservation of citrus fruit [J]. Lwt, 2021, 141: 110924.
- [26] RAKMAI J, CHEIRSILP B, MEJUTO J C, et al. Antioxidant and antimicrobial properties of encapsulated guava leaf oil in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin [J]. Industrial crops and products, 2018, 111: 219-225.
- [27] ZIAEE M, MOHARRAMIPOUR S, MOHSENIFAR A. MA-chitosan nanogel loaded with *Cuminum cyminum* essential oil for efficient management of two stored product beetle pests [J]. Journal of pest science, 2014, 87(4): 691-699.
- [28] DE SOUZA E L, SALES C V, DE OLIVEIRA C E V, et al. Efficacy of a coating composed of chitosan from *Mucor circinelloides* and carvacrol to control *Aspergillus flavus* and the quality of cherry tomato fruits [J]. Frontiers in microbiology, 2015, 6: 732.
- [29] GE X, HUANG Z, TIAN S, et al. Complexation of carbendazim with hydroxypropyl- β -cyclodextrin to improve solubility and fungicidal activity [J]. Carbohydrate polymers, 2012, 89(1): 208-212.
- [30] 刘琛. 烟草青枯病菌生物熏蒸材料的筛选及条件优化[D]. 泰安: 山东农业大学, 2021.
- LIU C. Screening of biofumigation materials and optimization of conditions for *Ralstonia solanacearum* [D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2021.
- [31] 王惟萍, 石延霞, 赵一杰, 等. 土壤环境条件对威百亩熏蒸防治黄瓜枯萎病的影响[J]. 植物保护学报, 2017, 44(1): 159-167.
- WANG W P, SHI Y X, ZHAO Y J, et al. Effects of soil environment on the metam sodium fumigation against cucumber *Fusarium* wilt [J]. Journal of plant protection, 2017, 44(1): 159-167.
- [32] 刘国军. 植物精油及混用熏蒸剂对嗜卷书虱和赤拟谷盗的熏蒸控制作用[D]. 重庆: 西南大学, 2009.
- LIU G J. The fumigation effect of essential oils and mixtures on *Liposcelis bostrychophila* and *Tribolium castaneum* [D]. Chongqing: Southwest University, 2009.