



## 肉桂醛对烟草疫霉菌的体外抑制作用

凌天孝<sup>1</sup>, 陈健<sup>2</sup>, 薛延丰<sup>2</sup>, 周涵君<sup>1</sup>, 张晓帆<sup>1</sup>, 付仲毅<sup>1</sup>, 秦焱鹤<sup>1</sup>, 马静<sup>1</sup>,  
韩秋静<sup>1</sup>, 叶协锋<sup>1</sup>

1 河南农业大学烟草学院, 国家烟草栽培生理生化研究基地, 烟草行业烟草栽培重点实验室, 郑州 450002;

2 江苏省农业科学院食品质量安全与检测研究所, 南京 210014

**摘要:** 【目的】为探讨肉桂醛对烟草疫霉菌的体外抑制作用。【方法】以烟草疫霉菌为研究对象, 研究肉桂醛作用下烟草疫霉菌菌丝的径向生长和细胞膜透性, 通过菌丝 ROS 和 PI 荧光染色, 进一步测定菌丝丙二醛和甘油含量。【结果】(1) 肉桂醛能够有效地抑制烟草疫霉菌菌丝的径向生长和破坏菌丝形态, 抑制菌丝径向生长的  $EC_{50}$  值约为 0.93 mmol/L; (2) 烟草疫霉菌菌丝 ROS 和 PI 荧光染色结果显示, 经肉桂醛处理的菌丝, 其活性氧含量增加并出现细胞死亡现象, 并表现出浓度效应; (3) 随着肉桂醛处理浓度的升高, 烟草疫霉菌菌丝 MDA 和甘油含量以及细胞膜透性均呈现逐渐升高的趋势。【结论】肉桂醛可能通过增加烟草疫霉菌胞内 ROS 含量, 引发脂质过氧化反应, 刺激丙二醛产生, 从而使细胞膜受损, 进一步导致细胞死亡, 达到抑菌效果。

**关键词:** 肉桂醛; 烟草疫霉菌; 活性氧; 细胞膜; 抑菌

**引用本文:** 凌天孝, 陈健, 薛延丰, 等. 肉桂醛对烟草疫霉菌的体外抑制作用 [J]. 中国烟草学报, 2017, 23 (4)

烟草黑胫病是烟草生产中危害最严重的病害之一, 由烟草疫霉菌引起, 该病害发病率高, 分布范围广, 对烟草具有极强的破坏性<sup>[1-3]</sup>。据报道, 我国烟草黑胫病平均每年发病面积高达 76373 hm<sup>2</sup>, 产量损失约 2.87×10<sup>7</sup> kg, 产值损失超过 1.23 亿元人民币<sup>[4]</sup>。防治烟草黑胫病已经成为我国烟草行业可持续发展亟待解决的问题。

植物含有丰富的天然抗菌物质<sup>[5]</sup>, 这些物质不仅与环境相容性好, 有顺畅的降解途径, 而且不易使病菌产生抗药性<sup>[6]</sup>, 已成为当下研究热点。前人研究表明中草药提取物<sup>[7]</sup>、大蒜水提物和乙醇浸出物<sup>[8]</sup>以及桉树、兰香和菱叶叶片的提取物<sup>[9]</sup>对烟草黑胫病菌具有一定的抑制作用。肉桂醛 (Cinnamaldehyde) 是樟属植物精油的重要组成部分, 具有抗菌活性<sup>[10]</sup>、抗病毒活性<sup>[11]</sup>、抗癌活性<sup>[12]</sup>、抗氧化性和抗炎活性<sup>[13-14]</sup>等, 其药用价值已被高度认可。王帆等<sup>[15]</sup>采用肉汤稀释法研究了肉桂醛对大肠杆菌和绿脓杆菌的抑制作用, 发现经 10.0 mmol/L 的肉桂醛处理 2 h 和 3 h 后, 大肠杆菌和绿脓杆菌的菌丝生长和孢子萌

发完全受到抑制, 测得肉桂醛对大肠杆菌和绿脓杆菌的 MIC 分别为 2.5 mmol/L 和 5 mmol/L。目前, 肉桂醛应用于辣椒疫霉菌的研究报道较多, 刘丽等<sup>[16]</sup>通过体外抑制试验发现肉桂醛能够有效地抑制辣椒疫霉菌菌丝的径向生长和孢子萌发, 并引起孢子内 ROS 含量上升, 李丽娜等<sup>[17]</sup>用肉桂醛处理后的辣椒疫霉菌孢子接种辣椒幼苗, 与接种致病性菌株的植株相比, 其植株长势良好, 鲜重、叶绿素含量、抗氧化酶活性和抗氧化物质含量等指标显著优于后者。

本研究应用不同浓度肉桂醛处理烟草疫霉菌, 探索肉桂醛对菌丝 ROS 含量及质膜透性等方面的影响, 确定其抑菌作用, 以期为烟草黑胫病的防治提供依据。

### 1 材料和方法

#### 1.1 试验材料与试剂

供试菌株: 烟草疫霉菌 (*Phytophthora nicotianae*) 由河南农业大学植物保护学院惠赠。

主要试剂: 肉桂醛 (Cinnamaldehyde, CA) 购于 Aladdin 公司, 纯度大于 95%, 用二甲基亚砜

**基金项目:** 烟草行业烟草栽培重点实验室资助项目 (30800665), 重庆市烟草公司“云烟品牌导向型生态优质烟叶生产技术模式构建研究与推广”(NY20140401070010)

**作者简介:** 凌天孝 (1992—), 硕士研究生, 烟草栽培与生理生化, Tel: 0371-63555713, Email: 18837103304@163.com

**通讯作者:** 叶协锋 (1979—), 博士, 副教授, 烟草栽培及土壤保育, Tel: 0371-63555713, Email: yexiefeng@163.com

**收稿日期:** 2017-01-05; **网络出版日期:** 2017-03-14

(DMSO)溶解并配制成母液;微量丙二醛(MDA)试剂盒购于南京建成生物试剂公司;胞内甘油含量的测定试剂盒购于北京普利莱基因技术有限公司;PI荧光染料和ROS荧光染料购于碧云天公司;其他常规试剂(分析纯)均购于中国国药集团。

培养基:利马豆液体培养基:称取利马豆60 g,用蒸馏水冲洗,加入1 L去离子水煮沸30 min,四层纱布过滤,上清液定容至1 L,灭菌后常温保存。利马豆固体培养基:每升上清过滤液再加15~20 g琼脂,灭菌。

## 1.2 测定项目与方法

### 1.2.1 肉桂醛对烟草疫霉菌丝径向生长的影响

采用固体平板培养法,用打孔器(直径5 mm)从利马豆平板上菌落边缘截取菌饼,将菌丝面接种到含有终浓度为0 mmol/L、0.2 mmol/L、0.4 mmol/L、0.8 mmol/L、1.2 mmol/L、1.6 mmol/L、和2.0 mmol/L肉桂醛的利马豆固体培养基中央,封口、倒置于28℃恒温培养箱中培养约3 d。对照平板菌落直径大于6 cm时,采用十字交叉法测各处理平板的菌落直径,以0 mmol/L肉桂醛浓度处理为对照,计算肉桂醛对菌丝径向生长的抑制率。

生长抑制率=[(对照菌落直径-菌饼直径)-(处理菌落直径-菌饼直径)]/(对照菌落直径-菌饼直径)×100%。

### 1.2.2 菌丝形态显微观察

从新活化的利马豆固体培养基(不添加肉桂醛)上的菌落边缘截取数块菌饼(0.5 cm×0.5 cm),将菌饼转入100 mL利马豆液体培养基中(每份液体培养基中装5个菌饼),摇培(28℃,175 rpm)24 h后,向液体培养基中添加肉桂醛,使肉桂醛终浓度分别为0.4 mmol/L、0.8 mmol/L、1.2 mmol/L。以不加肉桂醛处理作为对照,继续摇培(28℃,175 rpm)24 h,然后用双层纱布过滤菌丝,剔除菌碟,去离子水冲洗3次,即完成菌丝的收集过程。置于显微镜下观察菌丝形态。

### 1.2.3 菌丝 ROS 染色

参照1.2.2的方法收集菌丝,在菌丝中加入2 μmol/L的ROS荧光探针,装载20 min后,用蒸馏水漂洗3次,置于荧光显微镜下观察并拍照(激发波长535 nm,发射波长615 nm)。

### 1.2.4 细胞膜透性测定

参照1.2.2的方法收集菌丝,称取0.5 g菌丝于20 mL蒸馏水中搅拌均匀,分别在0、5、10、20、40、60、80、100、120、140、160、180 min时测定溶液电导率值,180 min后,将菌丝置于沸水中煮5 min,

待冷却后测定其电导率值,根据以下公式计算其相对电导率值。

相对电导率(%)=不同时间电导率/最终电导率×100%<sup>[18]</sup>。

### 1.2.5 菌丝 MDA 含量测定

菌丝培养方法参照1.2.2。将菌丝置于预冷的研钵中,加适量液氮充分研磨,称0.1 g菌丝粉于2 mL离心管中,加入1 mL丙二醛提取液,涡旋混匀,5000g离心20 min,取上清液以微量丙二醛(MDA)试剂盒为标准品,测定待测样MDA含量。MDA含量(mmol/L)=[(测定OD值-对照OD值)/(标准OD值-空白OD值)]×标准品浓度(mmol/L)。

### 1.2.6 菌丝胞内甘油含量测定

采用甘油铜比色法测定菌丝中甘油的含量。标准曲线的绘制:将甘油溶于无菌蒸馏水中配成浓度为0、0.0025、0.003、0.004、0.005、0.006、0.008、0.01 g/mL的标准溶液移取上述甘油标准液10 mL于50 mL离心管中,依次加入1 mL 0.05 g/L CuSO<sub>4</sub>溶液和3.5 mL 0.05 g/mL NaOH溶液,100 r/min震荡12 min,4层擦镜纸过滤后,测定滤液中甘油铜在630 nm处的吸光度值。以甘油浓度为横坐标,以吸光度值为纵坐标绘制标准曲线。菌丝甘油含量的测定:采用1.2.2的方法收集菌丝,称取磨碎后的菌丝0.5 g于50 mL离心管中,加入20 mL无菌水,80℃水浴15 min,8500 r/min离心10 min,取上清液,以无菌水作为参比液,测定630 nm的吸光度值。根据标准曲线,计算菌丝中甘油的含量。

### 1.2.7 菌丝 PI 染色

菌丝培养方法参照1.2.2。在菌丝中加入2 μmol/L的PI荧光探针,染色20 min后,用蒸馏水漂洗3次,置于荧光显微镜下观察并拍照(激发波长535 nm,发射波长615 nm)。

## 1.3 数据分析

采用Excel 2003和SPSS 22.0进行数据处理和统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 肉桂醛对烟草疫霉菌丝径向生长的影响

由图1可以看出,肉桂醛对烟草疫霉菌丝径向生长有显著的抑制作用,并且这种抑制效果呈现浓度效应。用0.2 mmol/L肉桂醛处理烟草疫霉菌丝时,其径向生长开始出现抑制,生长抑制率为9.66%。肉桂醛浓度为0.8 mmol/L时的菌丝生长抑制率为48.91%。肉桂醛浓度增大到2.0 mmol/L时,菌丝基

本停止生长，抑制率高达 94.79%。通过线性回归分析可得，当菌丝生长抑制率达 50% 时，肉桂醛的浓度为 0.93 mmol/L，即 EC<sub>50</sub> 值为 0.93 mmol/L。

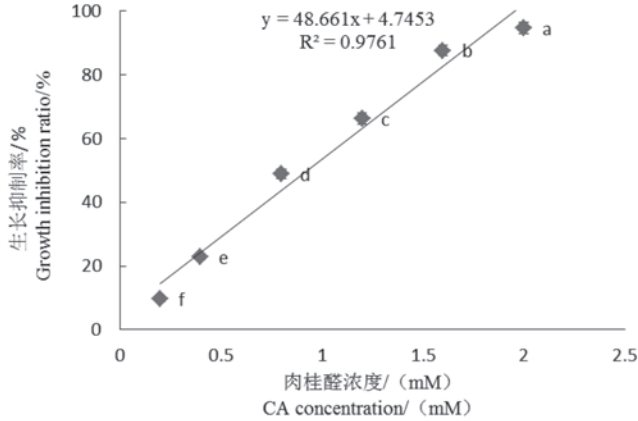


图 1 肉桂醛对烟草疫霉菌丝径向生长的影响

Fig.1 Effect of CA on radial growth of *P. nicotianae*

### 2.2 肉桂醛处理后的烟草疫霉菌丝形态变化

如图 2 所示，与对照相比，经肉桂醛处理的烟草疫霉菌菌丝发生变形，随肉桂醛浓度增大，菌丝变形严重。肉桂醛浓度为 1.2 mmol/L 时，菌丝发生明显的皱缩、扭曲甚至断裂。

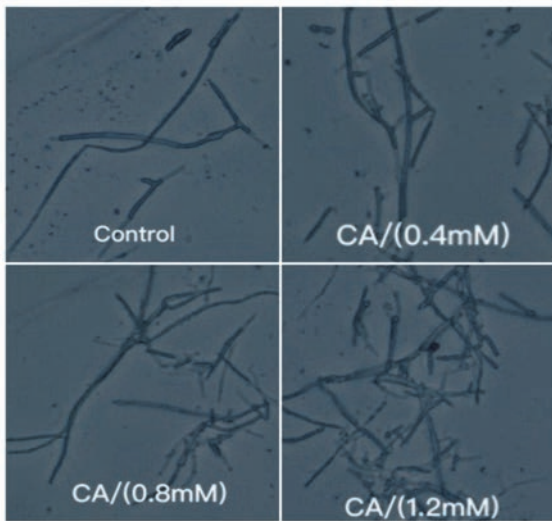


图 2 肉桂醛对烟草疫霉菌丝形态的影响

Fig.2 Effect of CA on morphology of *P. nicotianae*

### 2.3 肉桂醛处理后的烟草疫霉菌丝 ROS 染色效果

经 ROS 染色后，未经肉桂醛处理的对照菌丝仅出现轻微绿色荧光，肉桂醛处理的菌丝有不同程度的染色，其亮度均强于对照，且绿色荧光亮度随肉桂醛浓度的增大而增强（图 3），表明肉桂醛引起了烟草疫霉菌菌丝体内 ROS 含量增加。

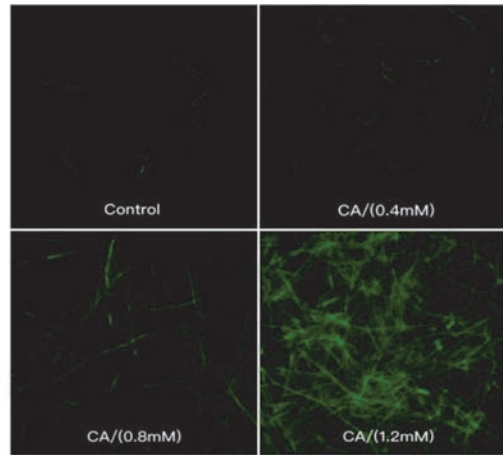


图 3 肉桂醛对烟草疫霉菌丝 ROS 含量的影响

Fig.3 Effect of CA on ROS content of *P. nicotianae* mycelial

### 2.4 肉桂醛对烟草疫霉菌细胞膜透性的影响

细胞膜透性变化如图 4 所示，肉桂醛处理的烟草疫霉菌菌丝溶液的电导率明显高于对照菌丝，且随着处理时间的延长和肉桂醛浓度的升高，其电导率呈上升趋势。未经肉桂醛处理的菌丝，其电导率增长速度较慢，在 80 min 后基本趋于稳定，而肉桂醛处理后菌丝电导率的增长速度明显较快，且在 80 min 后也有明显增长。这表明肉桂醛处理后破坏了菌丝细胞膜的完整性，随着细胞膜破裂，细胞内电解质外渗增多，从而引起细胞膜透性增大。

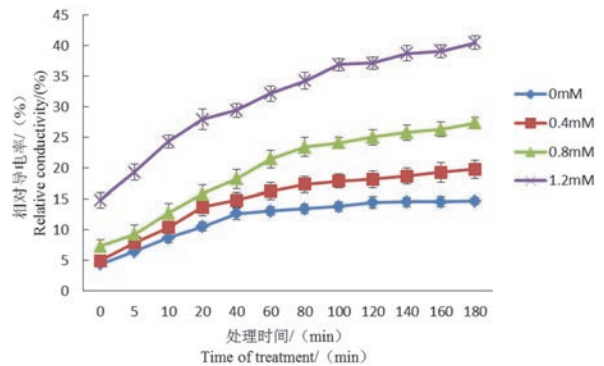


图 4 肉桂醛对烟草疫霉菌丝相对导电率的影响

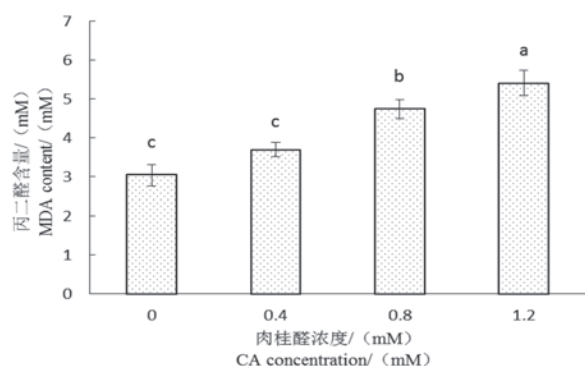
Fig.4 Effect of CA on relative conductivity of *P. nicotianae* mycelial

### 2.5 肉桂醛对烟草疫霉菌丝丙二醛 (MDA) 含量的影响

随着肉桂醛处理浓度的升高，烟草疫霉菌菌丝 MDA 含量呈逐渐上升趋势。肉桂醛处理浓度分别为 0.4、0.8、1.2 mmol/L 时，菌丝 MDA 含量分别比对



照增加了 21.73%、56.07%、77.92% (图 5), 说明肉桂醛诱发了菌丝膜脂损伤。



注: 未标有相同小写字母表示差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 下同

图 5 肉桂醛对烟草疫霉菌丝丙二醛含量的影响

Fig.5 Effect of CA on MDA content of *P. nicotianae*

## 2.6 肉桂醛对烟草疫霉菌丝甘油含量的影响

当真菌受到外界渗透压力胁迫时, 细胞内会积累甘油来维持细胞内外渗透压平衡<sup>[19]</sup>。烟草疫霉菌菌丝甘油含量随肉桂醛处理浓度升高而增加, 肉桂醛浓度分别为 0.4、0.8、1.2 mmol/L 时, 菌丝甘油含量分别为对照的 1.94 倍、2.59 倍和 3.39 倍, 各处理间差异达显著水平 (图 6)。由此可以推测肉桂醛引发细胞内外渗透压不平衡, 从而刺激了菌丝细胞积累甘油, 以此维持渗透压平衡。

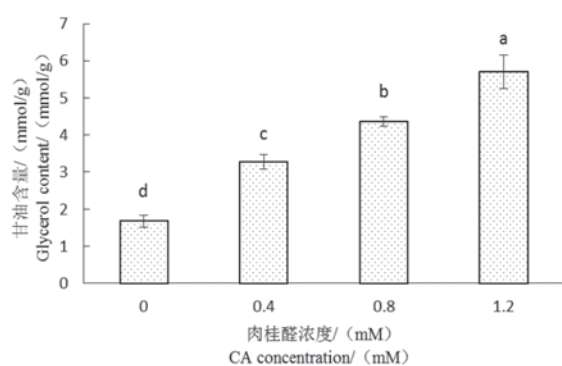


图 6 肉桂醛对烟草疫霉菌丝甘油含量的影响

Fig.6 Effect of CA on Glycerol content of *P. nicotianae*

## 2.7 肉桂醛处理后的烟草疫霉菌丝 PI 染色效果

与对照相比, 0.4 mmol/L 肉桂醛处理的烟草疫霉菌菌丝轻度染色, 随肉桂醛浓度增大, 菌丝红光亮度呈增强趋势 (图 7)。表明肉桂醛能够破坏烟草疫霉菌菌丝的细胞膜, 诱发菌丝细胞凋亡。

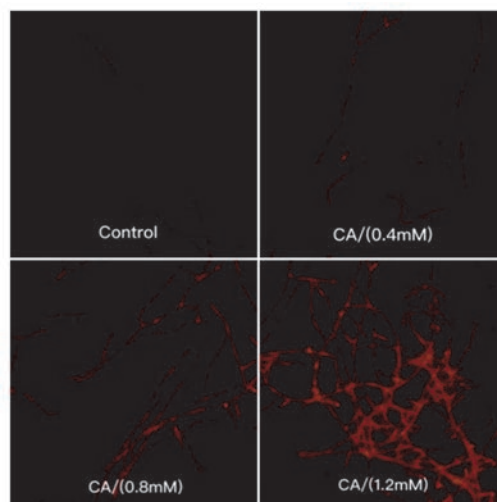


图 7 肉桂醛对烟草疫霉菌丝细胞死亡的影响

Fig.7 Effect of CA on cell death of *P. nicotianae*

## 3 讨论

大量研究表明肉桂醛具有广谱抗菌作用<sup>[20-24]</sup>, 它能预防和治疗多种细菌或真菌引起的疾病。薛延丰等<sup>[25]</sup>研究指出肉桂醛不仅可以对辣椒苗期灌根进行辣椒疫病预防, 还可以有效防治疫病的蔓延。肉桂醛是樟属植物精油的重要组成部分<sup>[26-27]</sup>, 它对人体无毒或低毒, 被美国食品和药物管理局认定为一个安全的食品级化学品<sup>[28-29]</sup>。目前有关植物源化合物抗菌活性方面的研究很多<sup>[30-31]</sup>, 但是抑菌机理研究尚少, 且尚无定论。在本研究中, 用一定浓度的肉桂醛处理烟草疫霉菌后, 其菌丝的径向生长受到显著的抑制作用, 菌丝形态发生明显的皱缩与扭曲, 肉桂醛抑制菌丝径向生长的  $EC_{50}$  值约为 0.93 mmol/L。荧光显微镜观察显示胞内 ROS 含量和细胞死亡率随肉桂醛浓度增大而呈现上升趋势。肉桂醛还可以引起菌丝 MDA、甘油含量以及细胞膜透性增大, 且呈浓度效应。

ROS 可以是细胞正常代谢的产物, 也可由外源性因素产生, 易与周围分子反应, 引起细胞损伤。在真菌代谢中, ROS 与真菌程序性死亡有很大的关系<sup>[32]</sup>。过量的 ROS 会刺激 MDA 大量产生<sup>[33]</sup>, MDA 是生物膜中不饱和脂肪酸分解的一种产物, 可与蛋白质、氨基酸、核酸等物质交联, 形成不溶性化合物沉淀, 从而造成细胞膜结构的损伤<sup>[34]</sup>。本研究结果表明, 经肉桂醛处理后, 烟草疫霉菌菌丝 ROS 大量积累, MDA 含量显著升高, 细胞膜透性增大, 这与戴向荣等<sup>[35]</sup>的研究结果一致。我们推测 ROS 的积累引起了脂质过氧化作用, 导致细胞膜损伤, 细胞

膜透性增大,MDA 的产生又进一步加剧了膜损伤,菌丝形态受破坏而发生皱缩、扭曲,这很有可能引起菌体内大分子代谢紊乱、细胞死亡,从而达到抑菌效果。

本研究还发现,肉桂醛显著增加了烟草疫霉菌胞内甘油含量。甘油是微生物渗透调节的主要因子<sup>[36]</sup>。在外界环境的刺激下菌株会激活相关信号转导途径,在菌丝体内合成积累甘油等渗透压稳定剂,这将引起细胞内渗透压升高,细胞外部的水会进入细胞内维持渗透压平衡,外部水的大量涌入会造成细胞膨胀,甚至破裂死亡。烟草疫霉菌经肉桂醛处理后,胞内甘油大量合成并积累,胞内膨压增大,有可能导致细胞膜破裂和细胞死亡。这进一步说明了肉桂醛对烟草疫霉菌菌丝体细胞膜有一定影响,可引起细胞膜损伤。

目前的研究普遍认为植物源化合物作用于微生物时,主要是通过破坏细胞膜、增大膜的选择通透性、降低微生物膜的稳定性来达到抑菌效果的<sup>[37-40]</sup>。本研究印证了这一点,推测肉桂醛主要通过引起烟草疫霉菌细胞膜透性增大,加剧膜损伤,造成细胞死亡从而达到抑菌效果。而且,本研究从MDA含量(脂质过氧化)、甘油含量(膨压)、电导率(膜透性)等多个方面讨论了膜损伤情况,不同指标共同验证了肉桂醛能够导致菌丝膜受损。但目前的研究都只集中在一些表面的生理现象,肉桂醛抑制烟草疫霉菌的机制尚未清楚。曾有报道指出肉桂醛破坏细胞质膜的抑菌机制可能存在两个作用靶点:一是质膜ATPase活性,另一个是麦角甾醇的生物合成<sup>[41]</sup>。而烟草疫霉菌属于卵菌纲疫霉属真菌,细胞膜上不含麦角甾醇,故而没有麦角甾醇合酶。这就表明肉桂醛可能是通过调节质膜ATPase的活性来达到抑菌效果的,但肉桂醛具体的作用靶标还有待进一步研究。

#### 4 结论

肉桂醛能够有效抑制烟草疫霉菌的生长,抑制菌丝径向生长 $EC_{50}$ 值约为0.93 mmol/L。肉桂醛可能通过增加胞内ROS含量,引发脂质过氧化反应,刺激MDA的生成,造成细胞膜损伤,导致细胞死亡,从而达到抑菌效果。

#### 参考文献

- [1] 陈泽斌,夏振远,雷丽萍,等.烟草黑胫病拮抗内生细菌的分离、鉴定及防效测定[J].中国烟草学报,2011,17(6):94-99.  
CHEN Zebin, XIA Zhenyuan, LEI Liping, et al. Isolation, identification and control efficacy determination of an endophytic strain against *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*[J]. *Acta Tabacaria Sinica*, 2011, 17(6):94-99.
- [2] Imazaki I, Nakaho K. Pyruvate-amended modified SMSA medium: improved sensitivity for detection of *Ralstoniasolanacearum*[J]. *Journal of General Plant Pathology*, 2010, 76(1):52-61.
- [3] Lamondia J A, Li D W, Madeiras A M, et al. First report of forsythia shoot blight caused by *Phytophthoranicotianae* in Connecticut[J]. *Plant Disease*, 2014, 98(9):1278-1278.
- [4] 陈瑞泰,朱贤朝,王智发,等.全国16个主产烟省(区)烟草侵染性病害调研报告[J].中国烟草科学,1997,(4):1-7.  
CHEN Ruitai, ZHU Xianchao, WANG Zhifa, et al. A report of investigating and studying tobacco infectious diseases of 16 main tobacco producing provinces (regions) in China[J]. *Chinese Tobacco Science*, 1997, (4):1-7.
- [5] Morcia C, Malnati M, Terzi V. In vitro antifungal activity of terpinen-4-ol, eugenol, carvone, 1,8-cineole (eucalyptol) and thymol against mycotoxigenic plant pathogens.[J]. *Food Additives & Contaminants Part A Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*, 2012, 29(3):415-22.
- [6] 于艳梅,丁伟,罗金香,等.植物源化合物对青枯雷尔氏菌的抑制作用研究[C]//中国植物保护学会2014年学术年会.2014.  
YU Yanmei, DING Wei, LUO Jinxiang, et al. The research of the inhibition of phytochemicals against *Ralstoniasolanacearum*[C]//The academic annual conference of China society of plant protection in 2014. 2014.
- [7] 杨晓凡,花日茂,吴祥为,等.抗烟草黑胫病菌的植物源杀菌剂的筛选研究[J].安徽农业大学学报,2006,33(2):189-191.  
YANG Xiaofan, HUA Rimao, WU Xiangwei, et al. Bioassay screening of medical herbs against *Phytophthoranicotianae* var. *nicotianae*[J]. *Journal of Anhui agricultural university*, 2006, 33(2):189-191.
- [8] 赖荣泉,姜林灿,陈志敏,等.大蒜粗提物对烟草黑胫病菌的室内抑制作用[J].烟草科技,2009,(9):62-64.  
LAI Rongquan, JIANG Lincan, CHEN Zhimin, et al. Inhibitory Effects of Garlic Extract on *Phytophthoraparasitica* var. *Nicotianae* in Laboratory[J]. *Tobacco Science & Technology*, 2009, (9):62-64.
- [9] Karegowda C, Gurumurthy B R, Naik R G. Evaluation of plant extracts and *Trichoderma* against *Phytophthoraparasitica* var. *nicotianae*[J]. *Mysore Journal of Agricultural Sciences*, 2009:231-233.
- [10] Shreaz S, Wani W A, Behbehani J M, et al. Cinnamaldehyde and its derivatives, a novel class of antifungal agents[J]. *Fitoterapia*, 2016, 112:116-131.
- [11] 刘蕾,曲章义,王淑秋,等.肉桂醛抗腺病毒作用研究[J].中国病理生理杂志,2011,27(8):1467-1471.  
LIU Lei, QU Zhangyi, WANG Shuqiu, et al. Anti-adenovirus effect of cinnamaldehyde[J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2011, 27(8):1467-1471.
- [12] 陈立平,张慧萍,陈光,等.肉桂油成分分析及肉桂醛体外抗肿瘤活性研究[J].中国微生态学杂志,2012,24(4):55-60.  
CHEN Liping, ZHANG Huiping, CHEN Guang, et al. Analysis of cinnamon oil composition and the anti-cancer effect of cinnamaldehyde[J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2012, 24(4):55-60.
- [13] Yang Dan, LIANG Xiaochun, SHI Yue, et al. Anti-Oxidative and

- Anti-Inflammatory Effects of Cinnamaldehyde on Protecting High Glucose-Induced Damage in Cultured Dorsal Root Ganglion Neurons of Rats[J]. Chinese Journal of Integrative Medicine, 2016, 22(1):19-27.
- [14] Rothwaller F, Moskovskich A, Gomezcasado C, et al. Immune Suppressive Effect of Cinnamaldehyde Due to Inhibition of Proliferation and Induction of Apoptosis in Immune Cells: Implications in Cancer[J]. Plos One, 2013, 9(10):e108402.
- [15] 王帆, 杨静东, 王春梅, 等. 肉桂醛对大肠杆菌和绿脓杆菌的作用机制[J]. 江苏农业学报, 2011, 27(4):888-892.  
WANG Fun, YANG Jingdong, WANG Chunmei, et al. Inhibitory effect of cinnamaldehyde against *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2011, 27(4):888-892.
- [16] 刘丽, 胡梁斌, 王德德, 等. 肉桂醛对辣椒疫霉的抑制作用[J]. 江苏农业学报, 2014, 30(2):282-288.  
LIU Li, HU Liangbin, WANG Dede, et al. Inhibition of *Phytophthora capsici* by cinnamaldehyde[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2014, 30(2):282-288.
- [17] 李丽娜, 石志琦, 高毅, 等. 肉桂醛对增强辣椒疫霉病抗性的作用机制研究[J]. 西北植物学报, 2016, 36(1):100-105.  
LI Lina, SHI Zhiqi, GAO Tao, et al. Mechanism Research on Cinnamaldehyde Enhances Pepper Resistance to *Phytophthora Blight* Disease[J]. Acta botanica boreali-occidentalisinica, 2016, 36(1):100-105.
- [18] 段亚冰. 咯菌腈对油菜菌核病菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 的作用机制研究[D]. 南京农业大学, 2013.  
DUAN Yabing. Mode of action of fludioxonil in *sclerotiniasclerotiorum*[D]. Nanjing agricultural university, 2013.
- [19] Wojda I, Alonso-Monge R, Bebelman J P, et al. Response to high osmotic conditions and elevated temperature in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by intracellular glycerol and involves coordinate activity of MAP kinase pathways.[J]. Microbiology, 2003, 149(Pt 5):1193-204.
- [20] Lecchi S, Allen K E, Pardo J P, et al. Conformational changes of yeast plasma membrane H(+)-ATPase during activation by glucose: role of threonine-912 in the carboxy-terminal tail.[J]. Biochemistry, 2006, 44(50):16624-32.
- [21] Domadia P, Swarup S, Bhunia A, et al. Inhibition of bacterial cell division protein FtsZ by cinnamaldehyde[J]. Biochemical Pharmacology, 2007, 74(6):831-840.
- [22] Youn H S, Lee J K, Yong J C, et al. Cinnamaldehyde suppresses toll-like receptor 4 activation mediated through the inhibition of receptor oligomerization[J]. Biochemical Pharmacology, 2008, 75(2):494-502.
- [23] 汪中兴, 侯永清, 窦茂鑫, 等. 3种饲用植物精油及其主要成分对猪源致病菌的抑菌作用研究[J]. 饲料研究, 2014, (13):42-45.  
WANG Zhongxing, HOU Yongqing, DOU Maoxin, et al. The Antifungal Effect of three kinds of forage plant essential oil and its main components on a porcine pathogenic bacteria[J]. Feed Research, 2014, (13):42-45.
- [24] 唐小辉. 肉桂醛、丁香酚及其结构类似物的抑菌活性与化学结构的关系[D]. 湘潭大学, 2013.  
TANG Xiaohui. The relationship between Cinnamaldehyde, Eugenol and structural analogues of antibacterial activity with chemical structure [D]. Xiangtan university, 2013.
- [25] 薛延丰, 陈健, 张猛, 等. 肉桂醛对辣椒生物量和品质影响及辣椒疫病防控效果初探[J]. 西南农业学报, 2014, 27(2):781-787.  
XUE Yanfeng, CHEN Jian, ZHANG Meng, et al. Preliminary Study of Cinnamaldehyde on Biomass and Quality in Pepper and Controlling Effect of *Phytophthora Blight*[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2014, 27(2):781-787.
- [26] Vangalapati M, Satya N S, Prakash D V S, et al. A review on pharmacological activities and clinical effects of Cinnamon species[J]. Research Journal of Pharmaceutical Biological & Chemical Sciences, 2012, 3(1):653-663.
- [27] Ranasinghe P, Pigera S, Premakumara G S, et al. Medicinal properties of 'true' cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*): a systematic review[J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2013, 13(1):275.
- [28] Cheng S S, Liu J Y, Chang E H, et al. Antifungal activity of cinnamaldehyde and eugenol congeners against wood-rot fungi[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(11):5145-9.
- [29] Liu G Q, Donoghue A M, Moyle J R, et al. Effects of Trans-Cinnamaldehyde on *Campylobacter* and Sperm Viability in Chicken Semen after In vitro Storage[J]. International Journal of Poultry Science, 2012, 11(8):536-540.
- [30] 岳东霞, 张要武, 韩桐华. 盐胁迫下芽孢杆菌对黄瓜灰霉病的防治作用[J]. 华北农学报, 2011, 26(1):196-199.  
YUE Dongxia, ZHANG Yaowu, HAN Tonghua. Biological Suppression of Grey Mold of Cucumber by *Bacillus RC1* under Saline Soil Conditions[J]. Acta agriculturae boreali-sinica, 2011, 26(1):196-199.
- [31] 杜立新, 冯书亮, 王容燕, 等. 拮抗 BS-208 菌株对番茄灰霉病诱导抗性的初步研究[J]. 华北农学报, 2005, 20(6):84-87.  
DU Lixin, FENG Shuliang, WANG Rongyan, et al. Preliminary Study on Induced Resistance of Antagonistic BS-208 to Tomato Grey Mould[J]. Acta agriculturae boreali-sinica, 2005, 20(6):84-87.
- [32] Takemoto D, Tanaka A, Scott B. NADPH oxidases in fungi: Diverse roles of reactive oxygen species in fungal cellular differentiation[J]. Fungal Genetics & Biology, 2007, 44(11):1065-76.
- [33] Aguirre J S, Hansberg W, Navarro R. Fungal responses to reactive oxygen species. Med Mycol 44:S101-S109[J]. Medical Mycology Official Publication of the International Society for Human & Animal Mycology, 2006, 44(s1).
- [34] 汪洪, 赵士诚, 夏文建, 等. 不同浓度镉胁迫对玉米幼苗光合作用、脂质过氧化和抗氧化酶活性的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2008, 14(1):36-42.  
WANG Hong, ZHAO Shicheng, XIA Wenjian, et al. Effect of cadmium stress on photosynthesis, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in maize (*Zea mays* L.) seedlings[J]. Plant nutrition and fertilizer science, 2008, 14(1):36-42.
- [35] 戴向荣, 蒋立科, 罗曼. 肉桂醛抑制黄曲霉机理初探[J]. 食品科学, 2008, 29(1):36-40.  
DAI Xiangrong, JIANG Like, LUO Man. Preliminary Study of Cinnamaldehyde Inhibition on *Aspergillus flavus*[J]. Food science, 2008, 29(1):36-40.

- [36] Pillonel C, Meyer T. Effect of Phenylpyrroles on Glycerol Accumulation and Protein Kinase Activity of *Neurospora crassa*[J]. Pest Management Science, 1997, 49(3):229-236.
- [37] Cox S D, Mann C M, Markham J L. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2001, 91(3):492-7.
- [38] Knobloch K, Pauli A, Iberl B, et al. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components.[J]. Journal of Essential Oil Research, 1989, 1(3):119-128.
- [39] 罗曼, 蒋立科, 吴子健. 柠檬醛对黄曲霉质膜损伤机制的初步研究 [J]. 微生物学报, 2001, 41(6):723-730.  
LUO Man, JIANG Like, WU Zijian. Preliminary study on citral impairs the aspergillus flavus membrane[J]. Acta microbiologica sinica, 2001, 41(6):723-730.
- [40] 罗曼, 蒋立科. 柠檬醛损伤黄曲霉线粒体生化机理的研究 [J]. 微生物学报, 2002, 42(2):226-231.  
LUO Man, JIANG Like. Study on Biochemical Mechanism of Citral Damage to the *A. flavus*'s Mitochondria[J]. Acta microbiologica sinica, 2002, 42(2):226-231.
- [41] Shreaz S, Sheikh R A, Bhatia R, et al. Antifungal activity of  $\alpha$ -methyl trans cinnamaldehyde, its ligand and metal complexes: promising growth and ergosterol inhibitors.[J]. BioMetals, 2011, 24(5):923-33.

### Inhibition effect of cinnamaldehyde against *Phytophthora nicotianae* in vitro

LING Tianxiao<sup>1</sup>, CHEN Jian<sup>2</sup>, XUE Yanfeng<sup>2</sup>, ZHOU Hanjun<sup>1</sup>, ZHANG Xiaofan<sup>1</sup>, FU Zhongyi<sup>1</sup>, QIN Yihe<sup>1</sup>, MA Jing<sup>1</sup>, HAN Qiuqing<sup>1</sup>, YE Xiefeng<sup>1\*</sup>

1 Tobacco Science College, Henan Agricultural University, National Tobacco Cultivation and Physiology and Biochemistry Research Centre, Key Laboratory for Tobacco Cultivation of Tobacco Industry, Zhengzhou 450002, China;

2 Institute of Food Quality and Safety, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China

**Abstract:**[Purpose] The aim of current study was to explore the inhibitory effects of Cinnamaldehyde (CA) on *Phytophthora nicotianae* in vitro. [Methods] *P. nicotianae* was used in this study. The effects of CA were investigated by measuring mycelial radial growth, mycelia membrane permeability, reactive oxygen species (ROS) and propidium (PI) fluorescence staining, malondialdehyde (MDA) and glycerol content. [Results] (1) CA efficiently inhibited the *P. nicotianae* mycelial radial growth and destroyed mycelial morphology, with an EC<sub>50</sub> value of 0.93mmol/L. (2) CA increased mycelial ROS level and cell death incidence in a dose-dependent manner, according to ROS and PI staining results. (3) The concentration increase in CA treatment led to the increment of mycelia membrane permeability and the content of mycelial MDA and glycerol. [Conclusion] CA may exhibit an antifungal effect on *P. nicotianae* through increasing ROS level, inducing lipid peroxidation, stimulating MDA production, damaging the mycelia membrane, and leading to cell death.

**Keywords:** cinnamaldehyde; *Phytophthora nicotianae*; ROS; cell membrane; antifungal

**Citation:** LING Tianxiao, CHEN Jian, XUE Yanfeng, et al. Inhibition effect of cinnamaldehyde against *Phytophthora nicotianae* in vitro [J]. Acta Tabacaria Sinica, 2017, 23(4)

\*Corresponding author. Email: yexiefeng@163.com