

异补骨脂素对黄瓜细菌性角斑病菌的抑制活性及作用机制

高晶鑫¹, 刘凌云², 李筱芊², 关丽杰^{2*}

1 沈阳化工大学 化学工程学院, 辽宁 沈阳

2 沈阳化工大学 环境与安全工程学院, 辽宁 沈阳

高晶鑫, 刘凌云, 李筱芊, 关丽杰. 异补骨脂素对黄瓜细菌性角斑病菌的抑制活性及作用机制[J]. 微生物学报, 2026, 66(8): 3839-3850.

GAO Jingxin, LIU Lingyun, LI Xiaoqian, GUAN Lijie. Inhibitory activity and mechanism of action of isopsoralen against *Pseudomonas amygdali* pv. *lachrymans*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2026, 66(8): 3839-3850.

摘要:【目的】阐明补骨脂种子提取物中抑制黄瓜细菌性角斑病菌(*Pseudomonas amygdali* pv. *lachrymans*, Pal)的主要活性成分及其抑菌机制。【方法】采用液体培养法测定异补骨脂素对黄瓜细菌性角斑病菌生长曲线的影响及其最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC); 采用透射电镜观察及生理生化手段探究其作用机制。【结果】异补骨脂素对该病原菌的 MIC 为 400 mg/L。该化合物通过破坏细菌细胞壁与细胞膜的完整性引发胞内物质外泄; 通过抑制呼吸链脱氢酶活性干扰细胞能量代谢; 通过抑制菌体群集运动、泳动及生物被膜形成影响病原菌对环境变化的响应及其在宿主体内的定殖。【结论】异补骨脂素通过结构损伤、能量阻断、毒力抑制等途径协同发挥对 Pal 的抑制活性, 使其丧失侵染宿主的能力。本研究为植物源杀菌剂补骨脂种子提取物在黄瓜细菌性角斑病绿色防控中的应用提供了理论依据。

关键词: 异补骨脂素; 黄瓜细菌性角斑病菌; 生理生化机制

资助项目: 国家重点研发计划(SQ2020YFF0411744)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (SQ2020YFF0411744).

*Corresponding author. E-mail: guanlijie6868@syuct.edu.cn

Received: 2026-01-27; Accepted: 2026-04-13; Published online: 2026-05-09

Inhibitory activity and mechanism of action of isopsoralen against *Pseudomonas amygdali* pv. *lachrymans*

GAO Jingxin¹, LIU Lingyun², LI Xiaoqian², GUAN Lijie^{2*}

¹ College of Chemical Engineering, Shenyang University of Chemical Technology, Shenyang, Liaoning, China

² College of Environmental and Safety Engineering, Shenyang University of Chemical Technology, Shenyang, Liaoning, China

Abstract: [Objective] To elucidate the primary bioactive component in *Psoralea corylifolia* seed extract that is responsible for inhibiting *Pseudomonas amygdali* pv. *lachrymans* (Pal) and to characterize its antibacterial mechanism. [Methods] The effect of isopsoralen on the growth curve of Pal and its minimum inhibitory concentration (MIC) were determined by the liquid culture assay. The antibacterial mechanism was investigated by transmission electron microscopy (TEM) combined with physiological and biochemical analyses. [Results] The MIC of isopsoralen against Pal was 400 mg/L. Isopsoralen disrupted the integrity of the bacterial cell wall and cell membrane, leading to leakage of intracellular contents. It interfered with cellular energy metabolism by inhibiting the activity of respiratory chain dehydrogenases. In addition, it impaired bacterial responses to environmental changes and colonization in the host by suppressing swarming motility, swimming motility, and biofilm formation. [Conclusion] Isopsoralen exerts its inhibitory activity against Pal through the synergistic actions of structural damage, energy disruption, and virulence suppression, ultimately abolishing the pathogen's ability to infect the host. These findings provide a theoretical basis for the application of *P. corylifolia* seed extract as a botanical bactericide in the green management of cucumber bacterial angular leaf spot.

Keywords: isopsoralen; *Pseudomonas amygdali* pv. *lachrymans*; physiological and biochemical mechanism

在设施园艺工程领域，黄瓜因其产量高、效益好，已成为我国塑料大棚中的主要蔬菜作物之一^[1]。黄瓜具有喜温喜湿的生长特性，在保护地栽培条件下易发生多种病害，其中细菌性角斑病危害尤为严重，可造成 30%–50% 的产量损失^[2-3]。引起该病害的病原菌为扁桃假单胞菌流汨致病变种黄瓜细菌性角斑病菌 (*Pseudomonas amygdali* pv. *lachrymans*, Pal)^[4-5]，可通过种子和土壤传播，经伤口或气孔侵入，引起水渍状病斑和菌脓溢出，严重时导致植株枯死^[6-7]。

目前，黄瓜细菌性角斑病的防治措施主要

包括农业防治、化学防治和生物防治^[8]。其中，化学防治是应用最为广泛的方法，常用药剂包括无机铜制剂、有机铜制剂及抗生素类药剂^[9-14]等。然而，长期连续使用易导致病原菌产生耐药性，并造成化学残留和环境污染^[15]。因此，开发绿色、高效的替代防治策略已成为当前研究的重点。

近年来，植物源杀菌剂因兼具直接抗菌、诱导植物免疫及促进生长等多重作用机制，且具有良好的环境兼容性而备受关注^[16]。补骨脂 (*Psoralea corylifolia* L.)种子提取物是一种植物源生物杀菌剂，目前已在田间应用于防治水稻稻

瘟病、苹果腐烂病^[17]、小麦赤霉病、茶饼病、黄瓜细菌性角斑病及烟草花叶病毒病等^[18]。研究表明,补骨脂种子提取物含有多种活性成分,其中对水稻稻瘟病菌等植物病原真菌^[19]起主要抑制作用的成分为黄酮类化合物苯丙烯菌酮(isobavachalcone, IBC),其通过破坏病原真菌细胞壁-膜系统及干扰糖代谢过程发挥杀菌作用^[20],并能通过激活植物免疫信号网络诱导植物产生抗病性^[21]。田间试验结果显示,补骨脂种子提取物在有效成分用量为 0.6–2.4 g a.i./hm² 时对黄瓜细菌性角斑病的防效可达 61%–83%^[22]。然而,该提取物对引起黄瓜细菌性角斑病的病原菌 Pal 的主活性成分及其作用机制尚不明确。目前,异补骨脂素在医药领域的研究已较为系统和深入,如在细胞层面能抑制胶质母细胞瘤细胞增殖、诱导细胞周期停滞及抑制迁移^[23],对牙龈卟啉单胞菌及生物膜有抑制作用且能减轻牙周膜细胞炎症^[24–25],还可通过骨形态发生蛋白 2 (bone morphogenetic protein 2, BMP-2)、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路诱导软骨分化^[26],但在植物病原细菌领域的相关研究仍较为匮乏。本研究筛选补骨脂种子提取物中抑制 Pal 的高活性成分,并从细胞膜完整性、能量代谢等层面解析其抑菌机制,以期为该提取物的田间应用和新型植物源杀菌剂的开发提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株

黄瓜细菌性角斑病菌 (*P. amygdali* pv. *lachrymans*), 又称扁桃假单胞菌, 由沈阳化工大学生物工程教研室从田间发病黄瓜植株上分离并保存。

1.1.2 主要试剂和仪器

异补骨脂素(纯度 99.08%)、补骨脂宁(纯度≥98%)、IBC (纯度≥98%)、补骨脂酚(纯度≥98%),

成都普菲德生物技术有限公司; 补骨脂种子提取物母药, 沈阳同祥生物农药有限公司; 3% 中生菌素可湿性粉剂, 远大作物科学(福建)有限公司; *N*-甲基吡咯烷酮(*N*-methylpyrrolidone, NMP) 和 Tween-80, 天津市大茂化学试剂合伙企业(有限合伙)。补骨脂种子提取物中各成分含量: 补骨脂酚 12.0%、补骨脂定 0.5%、补骨脂宁 1.0%、异补骨脂素 1.0%、补骨脂素 2.8%、苯丙烯菌酮 2.0%。

生化培养箱, 力辰科技有限公司; 灭菌锅, 上海申安医疗器械厂; 多功能酶标仪, 伯腾仪器有限公司; 台式高速冷冻离心机, 艾本德(上海)国际贸易有限公司; 恒温振荡培养箱, 上海精宏实验设备有限公司; 透射电子显微镜, HITACHI 公司。

1.2 供试菌株培养及药液配制

1.2.1 菌悬液的制备

将–80 °C 保存的 Pal 菌株在 LB 平板上划线活化, 置于 28 °C 培养箱中培养 24 h。挑取单一菌落转接至 10 mL LB 液体培养基中, 28 °C、180 r/min 扩大培养直至菌液进入对数生长期 ($OD_{600} \approx 0.6$), 4 °C、3 400×*g* 离心 5 min 收集菌体沉淀, 用 PBS 洗涤后重悬至 1×10^7 CFU/mL 备用。

1.2.2 药液配制

将异补骨脂素、补骨脂素、补骨脂宁、IBC、补骨脂定、补骨脂酚、补骨脂种子提取物等供试药剂用 NMP 溶解, 配制成质量浓度为 100 mg/mL 的溶液, 涡旋振荡并超声助溶, 将上述溶液用含 0.1% Tween-80 的无菌水稀释至 20 mg/mL 作为母液, 经 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 4 °C 避光保存备用, 用于后续高活性成分筛选试验。阳性对照药剂为 3% 中生菌素可湿性粉剂, 依据产品说明书推荐抑菌试验浓度, 用无菌水稀释配制, 备用。

1.3 活性筛选

采用液体培养法测定各供试药剂对 Pal 的抑

制活性。在 48.5 mL LB 液体培养基中加入 1 mL 对数生长期菌悬液(同 1.2.1 节)和 0.5 mL 供试药剂母液(同 1.2.2 节),使终浓度为 200 mg/L。以加入等体积无菌水为空白对照,加入含有等体积 NMP 的 Tween-80 水溶液为溶剂对照,每处理重复 3 次。于 28 °C、180 r/min 条件下振荡培养,待空白对照组菌液 OD_{600} 值达 0.3 左右,测定各处理 OD_{600} 值,按公式(1)计算抑制率。

$$\text{抑制率}=(A_0-A_1)/A_0\times 100\% \quad (1)$$

式中: A_0 为溶剂对照吸光值增加值, A_1 为药剂处理吸光值增加值。

1.4 异补骨脂素对 Pal 细胞超微结构的影响

在 48.75 mL LB 培养基中加入 1 mL 菌悬液(1×10^7 CFU/mL)与 0.25 mL 倍比稀释后的异补骨脂素母液(同 1.2.2 节),使异补骨脂素终浓度分别为 100 mg/L 和 50 mg/L, 28 °C、180 r/min 培养 2 h, 4 °C、 $13\,800\times g$ 离心 10 min 收集菌体。以等体积无菌水和 NMP 分别为空白对照和溶剂对照。

菌体样品经 2.5% 戊二醛(先室温固定 2 h, 后 4 °C 固定 3 h)及 1% 锇酸(室温 2 h)双重固定后,以 PBS 漂洗。随后依次进行丙酮梯度脱水、Spurr 812 环氧树脂包埋,并于 60 °C 下聚合。将包埋块切片(厚度约 70 nm)经醋酸铀和柠檬酸铅双重染色后,在透射电子显微镜下进行观察。

1.5 生理生化指标测定

1.5.1 最小抑菌浓度测定

参照 Yuan 等^[27]采用微量肉汤稀释法测定最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)。取 534 μ L 异补骨脂素母液(同 1.2.2 节)倍比稀释于 10 mL LB 培养基中,配制成 1 067、533、267、133、67、33 mg/L 的含药培养基。取 150 μ L 含药培养基与 50 μ L 菌悬液(1×10^7 CFU/mL)混合于 96 孔板中,使异补骨脂素终浓度分别为 800、400、200、100、50、25 mg/L。以加入等体积无菌水为空白对照,28 °C 培养 12 h,肉眼观察无

明显菌体生长的最低药物浓度定义为 MIC,重复 3 次。

1.5.2 异补骨脂素对 Pal 生长曲线的影响

在 8.9 mL LB 液体培养基中加入 1 mL 菌悬液(1×10^7 CFU/mL)和 0.1 mL 倍比稀释后的异补骨脂素母液(同 1.2.2 节),使培养基中异补骨脂素终浓度分别为 200、100、50 mg/L。以无菌水为空白对照,等量 NMP 为溶剂对照,有效成分浓度为 100 mg/L 的 3% 中生菌素可湿性粉剂为阳性对照,每处理重复 3 次。于 28 °C、180 r/min 培养 7 h,其中每隔 1 h 取样测定 OD_{600} 值,以时间为横坐标、 OD_{600} 值为纵坐标绘制生长曲线。

1.5.3 群集运动与泳动能力测定

群集运动培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, NaCl 5.0, 葡萄糖 5.0, 琼脂 5.0; 泳动培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, NaCl 3.0, 琼脂 3.0。

参照 Zhang 等^[28]方法并改进。向 49.75 mL 群集运动培养基和 49.75 mL 泳动培养基中分别加入 0.25 mL 异补骨脂素母液倍比稀释液,使终浓度为 100 mg/L 和 50 mg/L,空白对照为等体积无菌水。于培养基中央点接菌悬液(5 μ L, 1×10^7 CFU/mL), 28 °C 静置培养 48 h, 十字交叉法测量迁移直径,取平均值,按公式(2)计算迁移抑制率。

$$\text{迁移抑制率}=(A_0-A_1)/A_0\times 100\% \quad (2)$$

式中: A_0 为空白对照菌落直径, A_1 为药剂处理菌落直径。

1.5.4 胞外 RNA 泄漏测定

参照 Shi 等^[29]的方法并略作改进。参照 1.5.2 节方法,同条件培养。培养期间每隔 30 min 取 1 mL 培养液, 4 °C、 $2\,300\times g$ 离心 10 min。取 200 μ L 上清液,以无菌 LB 培养基为空白对照调零,用微量紫外分光光度计测定 OD_{260} 值(光程 1 cm)。以 OD_{260} 值变化反映细胞膜通透性改变导致的胞外核酸泄漏水平。

1.5.5 生物被膜抑制率测定

参照曾桃花等^[30]的方法并略作改进。取

67 μL 异补骨脂素母液(同 1.2.2 节)经倍比稀释于 10 mL LB 培养基中, 配制成 133、67、33 mg/L 的含药培养基。96 孔板中每孔加入 150 μL 含药培养基与 50 μL 菌悬液(1×10^7 CFU/mL), 使异补骨脂素终浓度分别为 100、50、25 mg/L。28 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 24 h 诱导生物被膜形成。弃培养液, PBS 漂洗 3 次, 60 $^{\circ}\text{C}$ 烘干 30 min, 0.1% 结晶紫 150 μL 染色 15 min, 去离子水漂洗 3 次, 95% 乙醇脱色 30 min, 酶标仪于 590 nm 处测定 OD_{590} 。按公式(3)计算生物被膜形成抑制率。

$$\text{生物被膜形成抑制率} = (OD_{590\text{对照}} - OD_{590\text{样品}}) / OD_{590\text{对照}} \times 100\% \quad (3)$$

式中: $OD_{590\text{对照}}$ 为阴性对照组(不含药物)的 OD_{590} 平均值, $OD_{590\text{样品}}$ 为各药物处理组的 OD_{590} 平均值。

1.5.6 呼吸链脱氢酶活性测定

参照 Li 等^[31]的方法并略作改进。参照 1.5.2 节方法同条件培养。每隔 30 min 取样, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、2 300 $\times g$ 离心 10 min 收集菌体, PBS 洗涤 2 次, 用 PBS 重悬菌体并调整浓度至 1×10^8 CFU/mL。加入 0.5% 碘硝基四氮唑溶液[2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium chloride, INT] (pH 7.2), 28 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗反应 2 h, 甲醛终止, 丙酮:乙醇=1:1 (体积比)萃取后, 用酶标仪测定 OD_{490} 值。 OD_{490} 值与呼吸链脱氢酶活性呈正相关。

1.6 数据分析

采用 Microsoft Excel 2021 和 Origin 2024 软件进行数据整理与绘图。采用 SPSS 27.0 软件进行单因素方差分析, 并采用 Duncan 法进行显著性分析, 以 $P < 0.05$ 表示差异显著。实验数据以平均值 $\pm$ 标准差表示。

2 结果与分析

2.1 补骨脂种子提取物和 6 种单体活性成分筛选结果

在 200 mg/L 浓度下, 补骨脂种子提取物中

6 种成分对 Pal 的抑菌活性存在显著差异(表 1)。异补骨脂素的抑菌活性最强, 抑制率为 86.076%; 补骨脂宁次之, 抑制率为 61.181%; 补骨脂素较弱, 抑制率为 35.021%; IBC 抑制率为 3.797%; 补骨脂定及补骨脂酚未表现出抑菌活性。

研究发现, 异补骨脂素对 Pal 的生长抑制作用呈浓度依赖性(图 1)。与空白对照(CK)相比, 50、100、200 mg/L 异补骨脂素处理均可延缓 Pal 进入对数生长期, 其中 200 mg/L 处理组的延迟效应最为显著。在相同浓度(100 mg/L)下, 异补骨脂素的抑菌效果显著优于对照药剂($P < 0.05$)。

采用微量肉汤稀释法测定了异补骨脂素对 Pal 的抗菌活性。根据 CLSI M07-A6^[32]标准, 其最小抑菌浓度为 400 mg/L (表 2)。

2.2 异补骨脂素在透射电镜下对病原菌超微结构的影响

透射电镜观察结果如图 2 所示。CK 组(图

表1 补骨脂种子提取物及其主要化学成分对Pal的抑菌活性

Table 1 Antibacterial activity of *Psoralea corylifolia* seed extract and its major chemical constituents against *Pseudomonas amygdali* pv. *lachrymans*

Different ingredients	Absorbance $\pm$ SD	Inhibition rate/%
IBC	0.228 $\pm$ 0.011c	3.797e
Corylin	0.092 $\pm$ 0.061e	61.181d
Psoralidin	0.538 $\pm$ 0.091a	–
Psoralen	0.154 $\pm$ 0.034cd	–
Bakuchiol	0.369 $\pm$ 0.030b	35.021c
Isopsoralen	0.033 $\pm$ 0.035d	86.076b
<i>Psoralea corylifolia</i> seed extract	0.031 $\pm$ 0.030d	86.920a
CK	0.228 $\pm$ 0.018c	
NMP and Tween-80	0.237 $\pm$ 0.014c	

All drug concentrations were 200 mg/L. – indicates a negative inhibition rate (possible growth promotion). Data are presented as mean $\pm$ SD ($n=3$). Different lowercase letters in the same column indicate significant differences ($P < 0.05$). The same below.

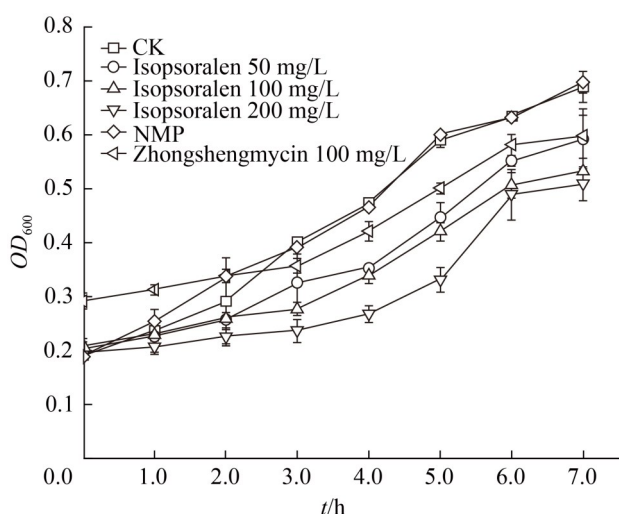


图1 异补骨脂素在不同浓度下对Pal生长曲线的影响

Figure 1 Effects of isopsoralen at different concentrations on the growth curve of *Pseudomonas amygdali* pv. *lachrymans*. Data are presented as mean $\pm$ SD ($n=3$).

表2 异补骨脂素在不同浓度下对液体培养Pal的抑菌活性

Table 2 Antibacterial activity of isopsoralen at different concentrations against *Pseudomonas amygdali* pv. *lachrymans* in liquid culture

Drug concentration/ (mg/L)	Absorbance $\pm$ SD	Inhibition rate/%	Visual observation
800	0.062 $\pm$ 0.014b	100.000f	Clear
400	0.064 $\pm$ 0.003c	100.000f	Clear
200	0.224 $\pm$ 0.010d	81.255e	Slightly turbid
100	0.442 $\pm$ 0.023e	63.013d	Turbid
50	0.686 $\pm$ 0.007f	42.594c	Turbid
25	0.886 $\pm$ 0.012g	25.858b	Turbid
0	1.195 $\pm$ 0.071a	0.000	Turbid

Absorbance values were subtracted from the LB medium blank (0.062).

2A、2E)菌体呈典型杆状,形态规整饱满,细胞壁与细胞膜结构清晰完整。NMP溶剂对照组(图2B、2F)菌体形态与CK组相比无明显差异,表明溶剂本身对菌体结构无影响。经50 mg/L异补

骨脂素处理(图2C、2G)后,菌体形态发生明显畸变,细胞壁与细胞膜出现破坏与溶解迹象;而100 mg/L处理组(图2D、2H)的损伤程度更为显著,表现为细胞膜破裂、胞内内容物严重外泄及细胞空泡化。上述结果表明,异补骨脂素对Pal细胞结构的破坏作用具有明显的浓度依赖性,为该化合物通过损伤细胞膜完整性发挥抑菌作用提供了直接证据。

2.3 异补骨脂素对病原菌群集运动和泳动能力的影响

细菌的群集运动与泳动能力依赖于鞭毛及IV型菌毛的协调作用,两者均有助于菌体在固体表面迁移,并参与生物被膜结构与形态的构建^[33]。

如图3所示,异补骨脂素可显著抑制Pal的运动能力。在群集运动实验中,0、50、100 mg/L异补骨脂素处理组的迁移直径分别为(12.00 $\pm$ 0.36)、(9.00 $\pm$ 0.25)、(7.00 $\pm$ 0.15) mm(图3A–3C),抑制率分别为25.00%和41.67%;在泳动实验中,不同浓度处理组的迁移直径分别为(21.00 $\pm$ 0.15)、(15.00 $\pm$ 0.21)、(11.00 $\pm$ 0.25) mm(图3D–3F),抑制率分别为28.57%和47.62%。上述结果表明,异补骨脂素可显著抑制Pal的运动能力,提示其可能通过干扰鞭毛或IV型菌毛相关功能影响菌体定殖及生物被膜形成。

2.4 异补骨脂素对病原菌RNA泄露量的影响

细胞膜完整性是维持细菌正常生理功能的基础,核酸泄漏量可作为评价膜损伤程度的重要指标。如图4所示,经50 mg/L和100 mg/L异补骨脂素处理1.5–2 h后,Pal胞外RNA含量持续上升;200 mg/L处理后胞外RNA浓度迅速上升并达最大值,0.5 h后各处理时间点间差异不显著。100 mg/L和200 mg/L异补骨脂素处理组各时间点的RNA含量均高于中生菌素处理组。上述结果表明,胞外RNA泄露量随异补骨脂素浓度升高而增加,细胞膜损伤程度与浓度

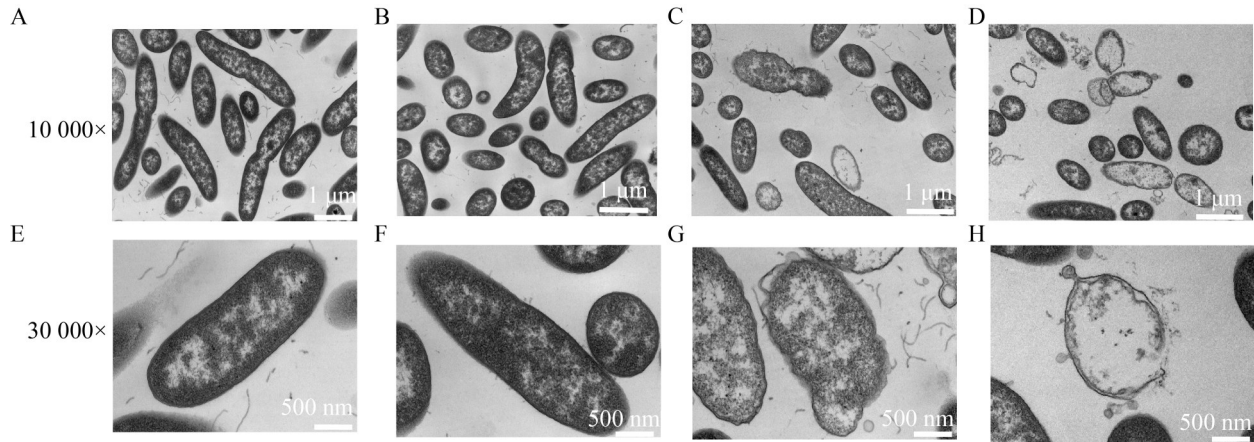


图2 透射电镜下异补骨脂素对Pal细胞形态结构的影响

Figure 2 Effects of isopsoralen on the cell morphology and ultrastructure of *Pseudomonas amygdali* pv. *lachrymans* as observed by transmission electron microscopy (TEM). A–D: CK, NMP solvent control, 50 mg/L and 100 mg/L isopsoralen treatment groups, respectively, with a magnification of 10 000×; E–H: CK, NMP solvent control, 50 mg/L and 100 mg/L isopsoralen treatment groups, respectively, with a magnification of 30 000×.

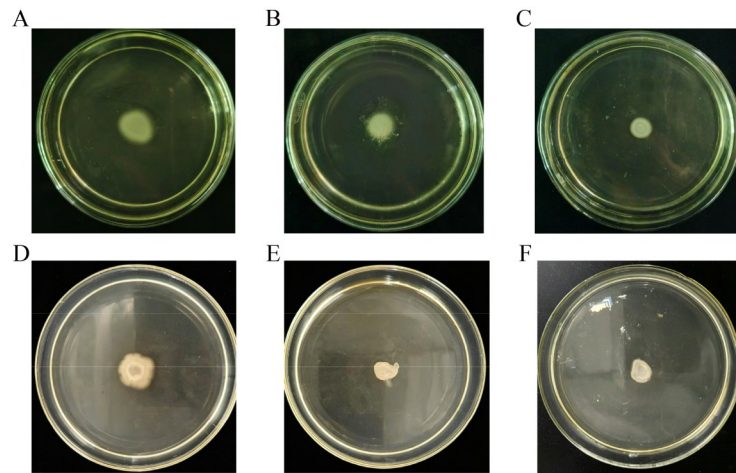


图3 异补骨脂素对Pal群集运动和泳动的影响

Figure 3 Effects of isopsoralen on swarming motility and swimming motility of *Pseudomonas amygdali* pv. *lachrymans*. A: CK group for swarming motility; B: 50 mg/L isopsoralen group for swarming motility; C: 100 mg/L isopsoralen group for swarming motility; D: CK group for swimming motility; E: 50 mg/L isopsoralen group for swimming motility; F: 100 mg/L isopsoralen group for swimming motility.

呈正相关。

2.5 异补骨脂素对病原菌生物被膜形成的影响

生物被膜是细菌抵御外界不良环境和抗菌

药物的重要屏障，抑制其形成对病害防控具有重要意义。如图 5 所示，异补骨脂素可有效抑制 Pal 生物被膜的形成。经 25、50、100 mg/L 异补骨脂素处理后，生物被膜形成量较对照组

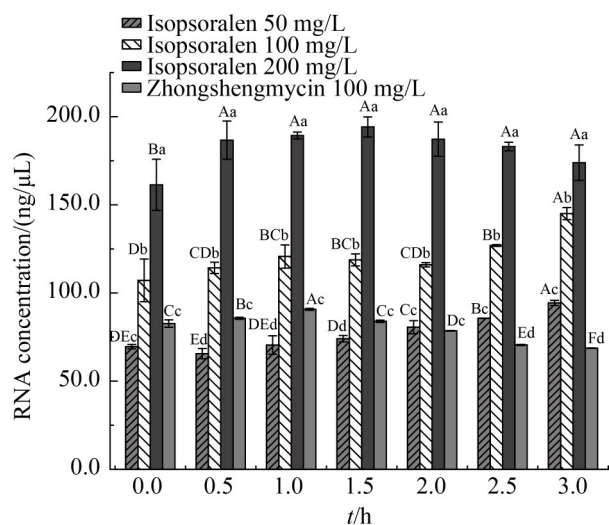


图4 异补骨脂素对Pal细胞RNA泄漏量的影响

Figure 4 Effects of isopsoralen on RNA leakage from cells of *Pseudomonas amygdali* pv. *lachrymans*. Different uppercase letters indicate significant differences among different time points for the same treatment ($P < 0.05$), while different lowercase letters indicate significant differences among different treatments at the same time point ($P < 0.05$).

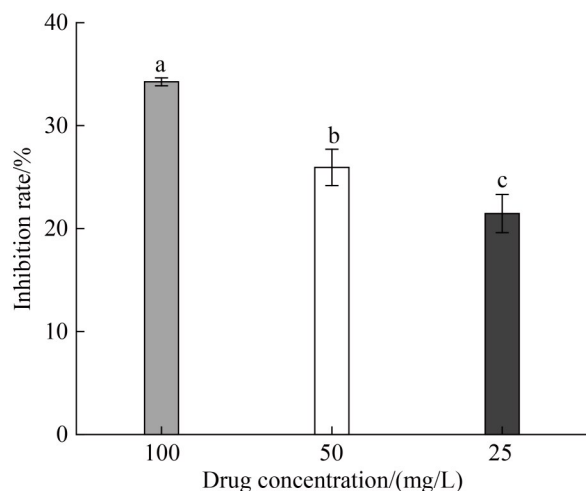


图5 不同浓度异补骨脂素对Pal生物被膜形成的影响

Figure 5 Effects of isopsoralen at different concentrations on biofilm formation of *Pseudomonas amygdali* pv. *lachrymans*.

分别降低 23.64%、26.67%、34.55%，抑制效果随浓度升高而增强，且各浓度组间差异显著($P < 0.05$)。该结果与文献[34]报道的天然产物干扰群体感应或黏附相关基因、进而抑制生物被膜形成的机制相符，提示异补骨脂素可通过阻碍生物被膜形成降低病原菌侵染宿主的能力。

2.6 异补骨脂素对病原菌呼吸链脱氢酶活性的影响

呼吸链脱氢酶是细菌能量代谢的关键酶，其活性变化可反映菌体的代谢状态。如图 6 所示，异补骨脂素可显著抑制 Pal 呼吸链脱氢酶活性，且抑制效果呈浓度依赖性。处理 3 h 后，50、100、200 mg/L 异补骨脂素处理组的脱氢酶抑制率分别为 59.81%、77.16%、81.17%。其中，100 mg/L 异补骨脂素的抑制率(77.16%)显著高于同浓度中生菌素(62.84%) ($P < 0.05$)。上述结果表明，异补骨脂素可通过抑制呼吸链脱氢酶

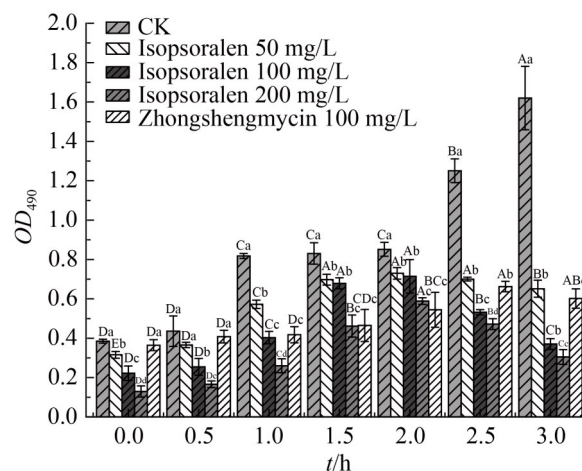


图6 异补骨脂素对Pal呼吸链脱氢酶活性的影响

Figure 6 Effect of isopsoralen on the activity of respiratory chain dehydrogenases in *Pseudomonas amygdali* pv. *lachrymans*. Different uppercase letters indicate significant differences among different time points for the same treatment ($P < 0.05$), while different lowercase letters indicate significant differences among different treatments at the same time point ($P < 0.05$).

活性干扰 Pal 的能量代谢, 这可能是其抑菌作用的重要靶点之一。

3 讨论

本研究对补骨脂种子提取物及其所含 6 种化合物的抑菌活性进行了测定。在 200 mg/L 浓度下补骨脂种子提取物、异补骨脂素、补骨脂宁、补骨脂素和 IBC 对液体培养 Pal 细胞生长的抑制率分别为 86.920%、86.076%、61.181%、35.021%、3.797%。可见, 异补骨脂素为抑制 Pal 的主活性成分。同时, 在 200 mg/L 补骨脂种子提取物中异补骨脂素的含量仅为 2 mg/L, 其他活性成分同样远低于实验中各化合物的测试浓度, 表明化合物间存在一定的协同作用。补骨脂定和补骨脂酚在 200 mg/L 浓度下表现出促进 Pal 生长的现象(表 1), 其吸光值显著高于对照组。这一现象符合毒物兴奋效应的特征, 即某些植物次生代谢物在亚抑制浓度下可通过激活微生物应激反应或干扰代谢调控网络产生短暂的生长刺激效应^[35]。这也体现了植物源农药多组分、多靶点的作用特点。

异补骨脂素的抑菌机制首先体现在对细胞屏障的直接破坏。透射电镜观察显示, 处理后菌体细胞壁/膜完整性受损、胞内物质外溢; RNA 泄漏实验进一步证实, 细胞膜通透性显著增加。这一作用模式与马伟虎等^[36]报道的香豆素类化合物通过破坏细胞膜通透性导致胞内物质外泄的抑菌机理一致。然而, 细胞膜作为维持渗透压与能量代谢的核心结构, 其完整性破坏也会导致能量产生系统的崩溃^[37]。

更深层的抑菌机制在于对能量代谢的干扰。INT 法检测显示, 异补骨脂素可显著抑制呼吸链脱氢酶活性。呼吸链脱氢酶是细菌电子传递与 ATP 合成的关键枢纽, 其活性被抑制将直接导致菌体能量生成障碍。值得注意的是, 膜损伤本身也会破坏跨膜质子梯度, 进一步加剧能量代谢紊乱。因此, 膜结构损伤与能量代谢抑制协同作用, 共同导致细菌对数生长期延迟, 最

终实现抑菌效果。

在结构损伤和能量代谢紊乱的基础上, 异补骨脂素进一步干扰了病原菌的毒力系统。实验表明, 50–100 mg/L 异补骨脂素可显著抑制 Pal 毒力表型, 呈剂量依赖性地降低泳动与群集运动能力, 并抑制生物被膜形成(50 mg/L 和 100 mg/L 处理组的抑制率分别为 26.67% 和 34.55%)。生物被膜是细菌应对外界环境胁迫、介导耐药与致病性的重要结构基础^[38], 其形成依赖于菌体黏附、运动及群体感应(quorum sensing, QS)网络的协同调控^[39–40], 而上述过程均为耗能过程, 高度依赖细胞内 ATP 水平。异补骨脂素诱导的能量代谢障碍必然会抑制这些耗能毒力表型的表达。此外, 作为香豆素类化合物, 异补骨脂素可能同时通过干扰 QS 信号转导^[41], 协同其对膜通透性和运动性的抑制效应, 阻断被膜发育进程, 进而减弱病原菌的定殖能力与逆境适应性。

相较于医药领域对香豆素类化合物的广泛研究, 其在农业领域的应用研究则相对薄弱。在医药研究领域, 补骨脂素可通过调控 Wnt/ β -catenin、PI3K/Akt 等关键信号通路调节成骨细胞与破骨细胞的分化及功能平衡, 改善骨代谢, 发挥治疗骨质疏松症的作用^[42]; 磺胺类香豆素新化合物具有较低的溶血活性, 可通过损伤细菌细胞膜发挥抑菌作用, 还能与细菌的二氢叶酸合成酶发生相互作用, 具有多靶点的应用潜力^[43]; 二氯乙酰胺基类香豆素新化合物能与细菌 DNA 促旋酶相互作用, 抑制 DNA 合成, 最终导致菌体死亡^[44]。与之不同的是, 异补骨脂素从细胞膜结构损伤、能量代谢紊乱、毒力系统干扰等多个层面协同抑菌, 呈现出多靶点、多通路的作用特点, 也为其在农业领域的开发应用提供了新的思路。

本研究表明, 补骨脂种子提取物中香豆素类化合物异补骨脂素是抑制植物病原细菌 Pal 的主要活性成分, 其作用于膜结构、能量代谢和毒力系统 3 个层面。结合实验室前期研究结果,

黄酮类化合物苯丙烯菌酮是抑制病原真菌的主要活性成分。上述研究表明,补骨脂种子提取物作为植物源农药,兼具抗细菌和抗真菌活性,且针对不同类型病原菌的作用靶点各异。这种多组分、多靶点的特性使其在实际应用中不易产生抗药性,具有显著优势。

4 结论

综上所述,补骨脂种子提取物中抑制 Pal 的主要活性成分为异补骨脂素。其作用机制表现为:破坏病原细菌细胞壁及细胞膜的完整性,干扰能量代谢过程,抑制菌体运动性及生物被膜形成,从而有效抑制病原细菌的生长与繁殖,削弱其侵染宿主的能力,最终实现对细菌性病害的防控。上述研究为补骨脂种子提取物在细菌性病害综合防控中的应用提供了理论依据。

作者贡献声明

高晶鑫:方法设计、调查研究、数据分析、结果可视化、论文撰写与修订;刘凌云:方法设计、协助实验、数据分析;李筱芊:协助实验、数据处理;关丽杰:审阅文章、数据解释及稿件最终审核与修订。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] 刘思涵, 周椿雨, 童子娟, 徐绍荣. 中国黄瓜出口贸易结构与国际竞争力分析[J]. 中国瓜菜, 2025, 38(3): 188-196.
Liu SH, Zhou CY, Tong ZJ, Xu SR. Analysis of China's cucumber export trade structure and international competitiveness[J]. China Cucurbits and Vegetables, 2025, 38(3): 188-196 (in Chinese).
- [2] 路粉, 张军, 吴杰, 毕秋艳, 刘翔宇, 赵建江, 王文桥. 设施黄瓜主要病害发生及综合防控[J]. 现代农药, 2024, 23(2): 22-25, 65.
Lu F, Zhang J, Wu J, Bi QY, Liu XY, Zhao JJ, Wang WQ. Occurrence and integrated control of major diseases on protected cucumber[J]. Modern Agrochemicals, 2024, 23(2): 22-25, 65 (in Chinese).
- [3] Meng XL, Xie XW, Shi YX, Chai AL, Ma ZH, Li BJ. Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay based on *hrpZ* gene for rapid detection and identification of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber leaves[J]. Journal of Applied Microbiology, 2017, 122(2): 441-449.
- [4] 李磊. 基于全基因组测序的黄瓜细菌性流胶病原菌致病力和比较基因组分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2018.
Li L. Pathogenicity and comparative genome analysis of the pathogens of cucumber bacterial flow gum disease based on whole genome sequencing[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2018 (in Chinese).
- [5] Jeong H, Kloepper JW, Ryu CM. Genome sequences of *Pseudomonas amygdali* pv. *tabaci* strain ATCC 11528 and pv. *lachrymans* strain 98A-744[J]. Genome Announcements, 2015, 3(3): e00683-15.
- [6] Arora P, Sharma DK. Occurrence, detection and transmission of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* from the seeds of cucumber (*Cucumis sativus* L.) in Rajasthan[J]. Journal of Plant Biota, 2025, 4(2): 46-54.
- [7] Li LL, Du CX, Wang L, Lai MX, Fan HF. Exogenous melatonin improves the resistance to cucumber bacterial angular leaf spot caused by *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*[J]. Physiologia Plantarum, 2022, 174(3): e13724.
- [8] 陈苗苗, 陈列忠. 植物细菌性病害及其防治措施[J]. 浙江农业科学, 2022, 63(8): 1798-1804, 1808.
Chen MM, CHEN LZ. Study on plant bacterial diseases and its prevention and control measures[J]. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, 2022, 63(8): 1798-1804, 1808 (in Chinese).
- [9] 中国农药信息网. 农药登记数据[EB/OL]. [2021-04-12]. <http://www.chinapesticide.org.cn/>.
China Pesticide Information Network. Pesticide registration data[EB/OL]. [2021-04-12]. <http://www.chinapesticide.org.cn/> (in Chinese).
- [10] 左经龙, 姜桂霞. 细菌性病害主要化学防治药剂[J]. 吉林蔬菜, 2016(3): 21-22.
Zuo JL, Jiang GX. Main chemical agents for the control of bacterial plant diseases[J]. Jilin Vegetables, 2016(3): 21-22 (in Chinese).
- [11] 张立新, 郎钰莹, 张静, 张石鑫, 张坡, 张熹晗. 作物细菌性病害防治药剂研究进展[J]. 中国农药, 2019(1): 15-25.
Zhang LX, Lang YY, Zhang J, Zhang SX, Zhang P, Zhang XH. Research progress on agents for controlling crop bacterial diseases[J]. Chinese Agrochemicals, 2019(1): 15-25 (in Chinese).
- [12] 于平平. 30亿元细菌性病害市场风口期已至[J]. 营销界, 2021(14): 28-34.
Yu PP. The 3 billion-yuan bacterial disease control market is entering a booming period[J]. Marketing Circles, 2021(14): 28-34 (in Chinese).
- [13] 于平平. 值得关注的细菌性病害热门药剂品类[J]. 营销界, 2021(14): 39-43.
Yu PP. Popular agent categories for bacterial diseases worthy of attention [J]. Marketing Circles, 2021(14): 39-43 (in Chinese).
- [14] 岳瑾, 董杰, 乔岩, 王伟青, 王品舒, 张金良, 袁志强. 几种生物药剂对黄瓜炭疽病、细菌性角斑病的防治效果研究[J]. 北京农业, 2015(31): 52-54.

- Yue J, Dong J, Qiao Y, Wang WQ, Wang PS, Zhang JL, Yuan ZQ. Control efficacy of several biological agents against cucumber anthracnose and bacterial angular leaf spot[J]. Beijing Agriculture, 2015(31): 52-54 (in Chinese).
- [15] Qiu DY, Ke MJ, Zhang Q, Zhang F, Lu T, Sun LW, Qian HF. Response of microbial antibiotic resistance to pesticides: an emerging health threat[J]. Science of the Total Environment, 2022, 850: 158057.
- [16] 赵永田, 王兴娥, 赵宇, 潘婷, 刘莉梅. 植物源抑真菌活性成分及抑菌机理研究现状与展望[J]. 农业与技术, 2022, 42(16): 26-29.
- Zhao YT, Wang XE, Zhao Y, Pan T, Liu LM. Research progress and prospect of antifungal active ingredients and antibacterial mechanism derived from plants[J]. Agriculture and Technology, 2022, 42(16): 26-29 (in Chinese).
- [17] 安澜, 关丽杰. 补骨脂种子提取物对苹果腐烂病菌的抑菌活性研究[J]. 中国南方果树, 2021, 50(5): 130-133.
- An L, Guan LJ. Antifungal activity of *Psoralea corylifolia* seed extract against *Valsa mali*[J]. South China Fruits, 2021, 50(5): 130-133 (in Chinese).
- [18] 张伟, 关丽杰. 0.2% 苯丙烯菌酮微乳剂的田间应用[J]. 农药, 2018, 57(11): 840-843.
- Zhang W, Guan LJ. Field application study of isobavachalcone 0.2% microemulsion[J]. Agrochemicals, 2018, 57(11): 840-843 (in Chinese).
- [19] 关丽杰, 赵礼慧, 邵双, 李海燕. 补骨脂抑菌活性成分分析及鉴定[J]. 中国生物防治学报, 2013, 29(4): 655-660.
- Guan LJ, Zhao LH, Shao S, Li HY. Analysis and identification of antifungal activity component of *Psoralea corylifolia* L[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2013, 29(4): 655-660 (in Chinese).
- [20] 刘雪, 关丽杰. 苯丙烯菌酮对水稻稻瘟病原真菌细胞壁膜的作用[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(22): 117-121.
- Liu X, Guan LJ. Antibacterial effects of isobavachalcone on cell wall and membrane of *Magnaporthe grisea*[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2019, 47(22): 117-121 (in Chinese).
- [21] Guan LJ, Shang JY, Li XL, Liu CJ, Liu LY, Lei XY. Mechanism of action of isobavachalcone in inducing resistance to tobacco mosaic virus disease in tobacco[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2024, 134: 102450.
- [22] 李月娟, 关丽杰. 补骨脂种子提取物微乳剂对黄瓜细菌性角斑病的田间防效试验[J]. 山地农业生物学报, 2021, 40(3): 83-87.
- Li YJ, Guan LJ. Field control effect of microemulsion of *Psoralea corylifolia* L. extract against *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*[J]. Journal of Mountain Agriculture and Biology, 2021, 40(3): 83-87 (in Chinese).
- [23] 王梦梦. 异补骨脂素通过下调 YAP 信号通路抑制胶质母细胞瘤的进展[D]. 杭州: 杭州师范大学, 2023.
- Wang MM. Angelicin impedes the progression of glioblastoma via inactivation of YAP signaling pathway[D]. Hangzhou: Hangzhou Normal University, 2023 (in Chinese).
- [24] 李笑甜. 补骨脂素与异补骨脂素对牙周病抗菌、抗炎及成骨作用研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2018.
- Li XT. Anti-bacteria, anti-inflammation and osteogenic effects of psoralen and angelicin on periodontitis[D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2018 (in Chinese).
- [25] 李笑甜, 周薇, 宋忠臣. 补骨脂素和异补骨脂素对人牙周膜细胞的抗炎作用[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2018, 38(2): 128-132.
- Li XT, Zhou W, Song ZC. Anti-inflammation effects of psoralen and angelicin on human periodontal ligament cells *in vitro*[J]. Journal of Shanghai Jiao Tong University (Medical Science), 2018, 38(2): 128-132 (in Chinese).
- [26] Li L, Eun JS, Nepal M, Ryu JH, Cho HK, Choi BY, Soh YJ. Isopsoralen induces differentiation of prechondrogenic ATDC5 cells via activation of MAP kinases and BMP-2 signaling pathways[J]. Biomolecules and Therapeutics, 2012, 20(3): 299-305.
- [27] Yuan ZJ, Aweya JJ, Li J, Wang ZY, Huang SY, Zheng MJ, Shi LF, Deng SG, Yang S. Synergistic antibacterial effects of low-intensity ultrasound and peptide LCMHC against *Staphylococcus aureus*[J]. International Journal of Food Microbiology, 2022, 373: 109713.
- [28] Zhang JM, Rui X, Wang L, Guan Y, Sun XM, Dong MS. Polyphenolic extract from *Rosa rugosa* tea inhibits bacterial quorum sensing and biofilm formation[J]. Food Control, 2014, 42: 125-131.
- [29] Shi YG, Zhu YJ, Shao SY, Zhang RR, Wu Y, Zhu CM, Liang XR, Cai WQ. Alkyl ferulate esters as multifunctional food additives: antibacterial activity and mode of action against *Escherichia coli in vitro*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(45): 12088-12101.
- [30] 曾桃花, 李文茹, 谢小保, 施庆珊, 张建设. 香茅醛对铜绿假单胞菌 PAO1 群体感应的抑制活性研究[J]. 生态科学, 2021, 40(4): 27-35.
- Zeng TH, Li WR, Xie XB, Shi QS, Zhang JS. Quorum sensing inhibitory activity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by citronellal[J]. Ecological Science, 2021, 40(4): 27-35 (in Chinese).
- [31] Li WR, Xie XB, Shi QS, Zeng HY, OU-Yang YS, Chen YB. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 85(4): 1115-1122.
- [32] Clinical and Laboratory Standards Institute. M07-methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard-12th edition[S]. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2024.
- [33] 郭娟, 张进, 王佳敏, 朱全山. 天然抗菌剂在食品包装中的研究进展[J]. 食品科学, 2021, 42(9): 336-346.
- Guo J, Zhang J, Wang JM, Zhu QS. Natural antibacterial agents and their application in food packaging: a review[J]. Food Science, 2021, 42(9): 336-346 (in Chinese).
- [34] 杨小宇, 王志刚, 徐伟慧, 旦真阿旺. 皮氏不动杆菌 LSQ 3 对贝莱斯芽孢杆菌 LSQ 19 成膜能力的影响及其基因组特性分析[J]. 微生物学报, 2026, 66(2): 753-769.
- Yang XY, Wang ZG, Xu WH, Danzhen Awang. Influence of *Acinetobacter pittii* LSQ 3 on the biofilm formation of *Bacillus velezensis* LSQ 19 and its genomic

- characteristics[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2026, 66(2): 753-769 (in Chinese).
- [35] Agathokleous E, Calabrese EJ, Barceló D. Environmental hormesis: new developments[J]. *Science of the Total Environment*, 2024, 906: 167450.
- [36] 马伟虎, 程红刚, 杨璟, 耿楠楠, 季竞宇, 张国财. 香豆素对灰葡萄孢霉菌抑菌作用机理初探[J]. *农药学学报*, 2020, 22(5): 775-781.
Ma WH, Cheng HG, Yang J, Geng NN, Ji JY, Zhang GC. Preliminary study on the antifungal mechanism of coumarin on *Botrytis cinerea*[J]. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2020, 22(5): 775-781 (in Chinese).
- [37] Poolman B. Physicochemical homeostasis in bacteria[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2023, 47(4): fuad033.
- [38] 冯健兴. 基于维生素B₂的光动力杀菌剂对食源性致病菌的杀灭研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2024.
Feng JX. Study on the inactivation of foodborne pathogenic bacteria by vitamin B₂-based photodynamic bactericides[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2024 (in Chinese).
- [39] 李斌, 唐乔梅, 张国庆, 刘宝平, 石雨, 谢关林. 生物膜在植物病原细菌与生防细菌中的功能研究[C]//中国植物病理学会第九届全国会员代表大会暨2010年学术年会论文集. 厦门, 2010: 292.
- [40] Hassan RM, Abd El-Maksoud MS, Ghannam IAY, El-Azzouny AA, Aboul-Enein MN. Synthetic non-toxic anti-biofilm agents as a strategy in combating bacterial resistance[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2023, 262: 115867.
- [41] Zhang MM, Han WY, Gu JM, Qiu C, Jiang QJ, Dong JB, Lei LC, Li FY. Recent advances on the regulation of bacterial biofilm formation by herbal medicines[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 1039297.
- [42] 马纪龙, 郝江峰, 李宁, 谢兴文, 齐鹏. 补骨脂素治疗骨质疏松症药理作用机制及研究进展[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2026, 32(2): 276-281.
Ma JL, Hao JF, Li N, Xie XW, Qi P. Pharmacological mechanism and research progress of psoralen in the treatment of osteoporosis[J]. *Chinese Journal of Osteoporosis*, 2026, 32(2): 276-281 (in Chinese).
- [43] 赵将胜. 香豆素类新化合物的合成及其抗微生物研究[D]. 重庆: 西南大学, 2024.
Zhao JS. Synthesis of novel coumarins and their antimicrobial studies[D]. Chongqing: Southwest University, 2024 (in Chinese).
- [44] 蒲江平. 香豆素类含氮衍生物的合成与活性评价[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2025.
Pu JP. Synthesis and activity evaluation of nitrogen-containing coumarin derivatives[D]. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2025 (in Chinese).