

# 西芹种子浸提液对黄瓜枯萎病菌化感作用机理的研究

贾俊英<sup>1</sup>, 云兴福<sup>2</sup>, 杜晓艳<sup>1</sup>

(1. 内蒙古民族大学 农学院, 内蒙古 通辽 028000; 2. 内蒙古农业大学 农学院, 内蒙古 呼和浩特 010018)

**摘 要:**用蒸馏水、乙醇、丙酮作为浸提剂,通过浸提法获得西芹种子的浸提液,在黄瓜第1真叶横宽5 cm 时进行2次灌根处理,然后于不同时期对其叶片内超氧阴离子、过氧化氢含量进行测定。结果表明:西芹种子浸提液处理后的黄瓜叶片内超氧阴离子、过氧化氢含量在取样前期高于对照,后期低于对照。超氧阴离子含量较对照升高的幅度范围为蒸馏水—12.05%~38.52%、乙醇—24.41%~109.46%、丙酮—11.04%~166.10%;过氧化氢含量较对照升高的幅度范围为蒸馏水—36.38%~16.26%、乙醇—35.58%~14.52%、丙酮—34.27%~41.36%。

**关键词:**西芹种子浸提液;黄瓜枯萎病菌;化感作用机理;黄瓜叶片;活性氧

**中图分类号:**S 432 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)24-0010-04

植物化感作用是植物或微生物的代谢活动对环境其它植物或微生物所产生的有利或不利的作用<sup>[1]</sup>。阐明生物间的化感作用及化学识别机制,将能重新审视它们的关系,有助于为符合可持续发展策略的植物保护提供新的机会<sup>[2-3]</sup>。关于植物与植物之间化感作用的机理已经有了很多的研究结果<sup>[4-6]</sup>,发现化感物质能影响植物生理生化过程的每一个方面,大多数化感物质是影响植物的细胞膜、能量产生和能量消耗过程,一部分化感物质还影响到特定酶活性和酶功能。也有研究表明,化感物质可促使植物产生对病原菌的抗性<sup>[7]</sup>。

关于西芹鲜根<sup>[8]</sup>、腐根<sup>[9]</sup>、种子<sup>[10]</sup>浸提液对黄瓜枯萎病的化感作用已有报道。现用西芹种子不同溶剂浸提液处理黄瓜幼苗,然后对黄瓜植株内与抗枯萎病密切相关的活性氧含量的变化进行分析,旨在从生理生化变化的角度探讨西芹种子浸提液处理后黄瓜产生抗枯萎病的原因,以明确西芹种子浸提液对黄瓜枯萎病菌的化感作用机理,也为开发西芹生物源农药提供理论依据。

第一作者简介:贾俊英(1973-),女,蒙古族,博士,讲师,现主要从事蔬菜病理及栽培生理方面的研究工作。E-mail:jjy509628@163.com。

责任作者:云兴福(1958-),男,回族,硕士,教授,博士生导师,现主要从事高寒地区蔬菜栽培生理的研究工作。E-mail:yxf5807@163.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30960068);内蒙古自治区科技攻关资助项目(20081503)。

收稿日期:2011-09-14

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试材为“美国西芹”种子,“津春4号”黄瓜。黄瓜种子4月25日浸种催芽后播于日光温室,营养钵大小为8 cm×8 cm(钵口直径×钵高),以混合均匀的温室土为栽培基质,每亩钵种植1株,常规管理。灌根前将西芹种子分别用80%乙醇、80%丙酮和蒸馏水3种浸提剂按1 g:5 mL进行浸提,常温下振荡浸提24 h后用4层纱布过滤,置于冰箱(4℃)中保存、备用。

### 1.2 试验方法

西芹种子各浸提母液以1:15的稀释浓度作为灌根用浸提液,当植株长到第1真叶横宽5 cm 时进行灌根处理,灌根进行2次,隔1 d 1次,每钵30 mL/次,每处理100钵,3次重复。各处理用相同稀释倍数的浸提剂分别做对照。分别于灌根前1 d 和2次灌根后1、4、7、10、13、18 d 随机取黄瓜同叶位的真叶进行项目测定。

### 1.3 项目测定

1.3.1 超氧阴离子自由基( $O_2^-$ )产生速率的测定 采用羟胺氧化法<sup>[11]</sup>测定。称取叶片0.5 g,放入冰浴的研钵中,加入50 mmol/L pH 7.8 磷酸缓冲液5 mL,研磨成匀浆,在12 000 r/min 4℃下离心20 min,上清液即为样品提取液。在试管中加入样品提取液0.5 mL,然后加入50 mmol/L pH 7.8 磷酸缓冲液0.5 mL和1 mmol/L 盐酸羟胺1 mL混匀,25℃放置1 h后,再加入1 mL 对氨基磺酸,1 mL  $\alpha$ -萘胺,混匀,置于25℃反应20 min,加入等体积的 $C_4H_{10}O$ (正丁醇)萃取,静置分层后取 $C_4H_{10}O$ 相,在530 nm 下比色,取2 min 内吸光值的变化值。

1.3.2 过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ )含量测定 采用 Sergiev 等<sup>[12]</sup>的方法,略有改动。称取叶片 0.5 g,放入冰浴的研钵中,加入 5 mL 0.1%的三氯乙酸研磨成匀浆,在 12 000 r/min,4℃下离心 20 min,上清液即为样品提取液。取 1 mL 的上清液于试管中,分别加入 0.1 mol/L pH 7.0 的磷酸缓冲液 1 mL 和 1 mol/L 的 KI 溶液 2 mL,摇匀,放置 20 min 后,在 390 nm 处测 OD 值。按同样程序制备  $\text{H}_2\text{O}_2$  标准曲线。

2 结果与分析

2.1 西芹种子不同浸提液处理后黄瓜叶片超氧阴离子( $\text{O}_2^-$ )含量

经西芹种子浸提液处理后黄瓜叶片内超氧阴离子含量呈先升高后降低的趋势,且前期处理高于对照,而后期处理低于对照(图 1~3,表 1)。

西芹种子蒸馏水浸提液处理后 1 d,超氧阴离子含量显著高于对照,其含量较对照升高的幅度范围为 -12.50%~38.52%。到处理后 4 d 其含量达最大值,

之后逐渐下降,到处理后 7 d,处理仍高于对照,处理后 1、4、7 d 分别较对照升高了 23.64%、38.52%、34.78%。蒸馏水处理 10 d 后处理和对照变化不明显,到处理后 18 d 稍低于对照。

西芹种子乙醇浸提液处理 1、4、7 d 后黄瓜叶片内超氧阴离子含量均高于对照,分别较对照升高了 82.93%、109.46%、94.67%,达到了显著水平,且其含量在处理 4 d 达到了最大值,之后逐渐下降,到处理后 10 d,处理低于对照。其含量较对照升高的幅度范围为 -24.41%~109.46%。

丙酮浸提液处理后 1 d,超氧阴离子含量极显著高于对照,之后逐渐升高,到处理后 4 d 达最大值,然后下降,处理后 7 d 处理仍高于对照,之后处理与对照变化不明显;丙酮浸提液处理后 1、4、7 d 黄瓜叶片内超氧阴离子含量分别较对照提高了 166.10%、47.08%、51.49%。其含量较对照升高的幅度范围为 -11.04%~166.10%。

表 1 西芹种子各浸提液处理后黄瓜叶片内超氧阴离子含量  
Table 1 ( $\text{O}_2^-$ ) content of the cucumber leaf treated with the extracts of the parsley seeds

处理 Treatment		取样日期 Sampling date						
		前 1 d	后 1 d	后 4 d	后 7 d	后 10 d	后 13 d	后 18 d
蒸馏水 Distilled water	CK		2.56	2.84	2.15	2.31	1.84	2.05
	处理	2.94	3.17	3.94	2.89	2.17	1.98	1.80
	与 CK 差异/%		23.64	38.52	34.78	-6.06	7.59	-12.50
乙醇 Alcohol	CK		1.91	3.45	1.75	2.70	2.96	2.49
	处理	2.94	3.50 *	7.23	3.40 *	2.19	2.24	2.24
	与 CK 差异/%		82.93	109.46	94.67	-18.97	-24.41	-10.28
丙酮 Acetone	CK		1.38	5.59	3.12	3.80	5.32	2.82
	处理	2.94	3.66 * *	8.23 * *	4.73 *	3.38	4.80	2.91
	与 CK 差异/%		166.10	47.08	51.49	-11.04	-9.65	3.31

注:“\*”表示显著差异( $P<0.05$ ),“\* \*”表示极显著差异( $P<0.01$ ),下同。

Note:“\*”mean significant different at 0.05 level respectively between treatment and control,“\* \*” mean significant different at 0.01 level respectively between treatment and control. The same as below.

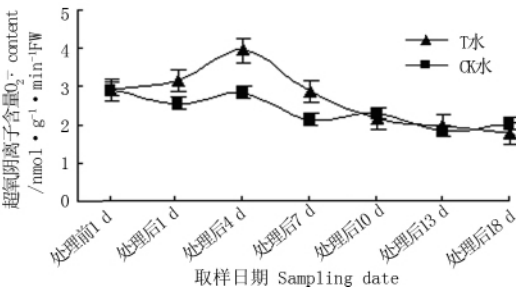


图 1 西芹种子蒸馏水浸提液处理后黄瓜叶片内超氧阴离子含量的变化  
Fig. 1 The changes of ( $\text{O}_2^-$ ) content of the cucumber leaf treated with distilled water extracts of parsley seeds

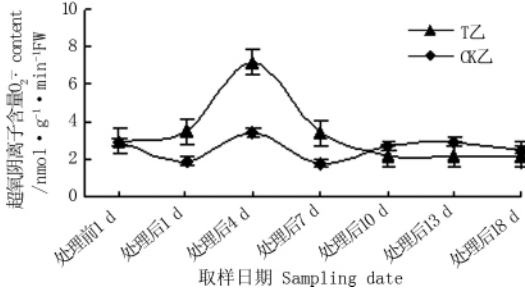


图 2 西芹种子乙醇浸提液处理后黄瓜叶片内超氧阴离子含量的变化  
Fig. 2 The changes of ( $\text{O}_2^-$ ) content of the cucumber leaf treated with ethanol extracts of parsley seeds

2.2 西芹种子不同浸提液处理后黄瓜叶片过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ )含量

经西芹种子各浸提液处理后,黄瓜叶片内过氧化氢含量呈先升高后降低的趋势,且在前期处理高于对照,而后期处理低于对照(图 4~6,表 2)。

西芹种子蒸馏水浸提液处理后 1 d,过氧化氢含量

高于对照,且其含量达最大值,之后逐渐下降,到处理后 4 d,处理仍高于对照,处理后 1、4 d 分别较对照升高了 16.26%、14.13%。蒸馏水处理 7 d 后,处理和对照变化不明显,甚至低于对照。其含量的变化幅度范围为 -36.38%~16.26%。

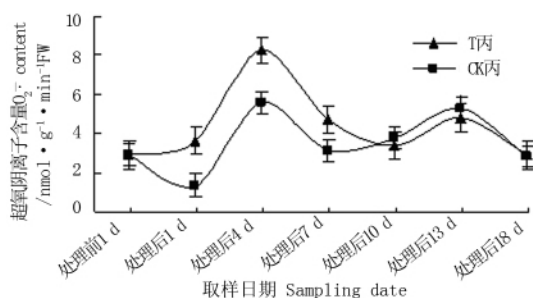


图3 西芹种子丙酮浸提液处理后黄瓜叶片内超氧阴离子含量的变化

Fig. 3 The changes of ( $O_2^-$ ) content of the cucumber leaf treated with acetone extracts of parsley seeds

西芹种子乙醇浸提液处理后, 黄瓜叶片内过氧化氢很快升到最高, 处理 1 d 后比对照升高了 14.52%, 之后过氧化氢含量呈下降趋势, 处理后 7、10 d 显著低于对照, 其它变化不明显。其含量的变化幅度范围为 -35.58%~14.52%。

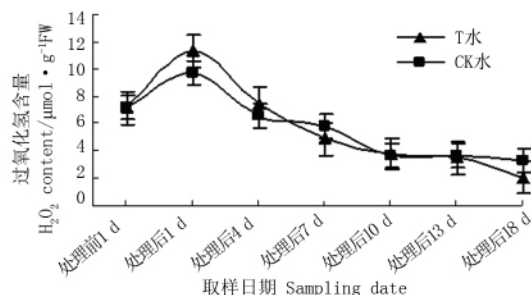


图4 西芹种子蒸馏水浸提液处理后黄瓜叶片内过氧化氢含量的变化

Fig. 4 The changes of  $H_2O_2$  content of the cucumber leaf treated with distilled water extracts of parsley seeds

丙酮浸提液处理后 1 d, 过氧化氢含量极显著高于对照, 且达到最大值后下降, 处理后 4 d 处理仍高于对照, 处理后 1、4 d 分别较对照提高了 41.36%、18.50%。到处理后 10 d, 其含量处理低于对照, 之后变化不很明显。其含量变化幅度范围为 -34.27%~41.36%。

表 2

西芹种子各浸提液处理后黄瓜叶片内过氧化氢含量

Table 2

$H_2O_2$  content of the cucumber leaf treated with the extracts of the parsley seeds

$\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$

处理 Treatment		取样日期 Sampling date						
		前 1 d	后 1 d	后 4 d	后 7 d	后 10 d	后 13 d	后 18 d
蒸馏水 Distilled water	CK		9.75	6.53	5.75	3.69	3.63	3.26
	处理	7.14	11.33	7.46 *	4.89	3.79	3.48	2.07
	与 CK 差异/%		16.26	14.13	-14.97	2.64	-4.28	-36.38
乙醇 Alcohol	CK		9.84	7.78	7.19	6.05	3.59	3.67
	处理	7.14	11.27	8.33	5.29 *	3.90 *	4.06	3.36
	与 CK 差异/%		14.52	7.13	-26.44	-35.58	12.98	-8.47
丙酮 Acetone	CK		10.33	7.56	6.84	4.82	4.28	4.56
	处理	7.14	14.60 *	8.96	5.37	4.08 *	4.32	3.00
	与 CK 差异/%		41.36	18.50	-21.43	-15.38	0.83	-34.27

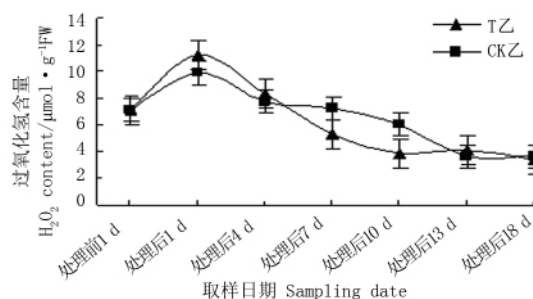


图5 西芹种子乙醇浸提液处理后黄瓜叶片内过氧化氢含量的变化

Fig. 5 The changes of  $H_2O_2$  content of the cucumber leaf treated with ethanol extracts of parsley seeds

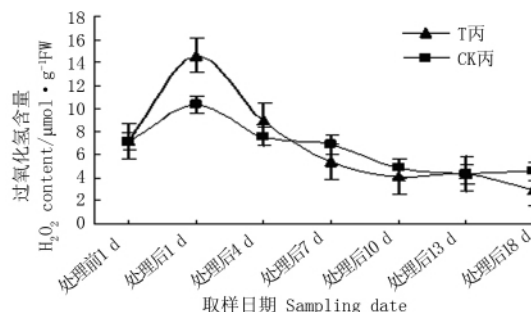


图6 西芹种子丙酮浸提液对黄瓜叶片过氧化氢含量的变化

Fig. 6 The changes of  $H_2O_2$  content of the cucumber leaf treated with acetone extracts of parsley seeds

### 3 讨论与结论

在植物抗病反应中, 活性氧主要包括: 超氧阴离子 ( $O_2^-$ )、羟自由基 ( $\cdot\text{OH}$ ) 和过氧化氢 ( $H_2O_2$ )。活性氧的产生途径为植物质膜中的激发子受体可能活化 G 蛋白和磷酸脂酶 C, 引起细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  和蛋白质磷酸化,

最终在质膜中形成活化 NADPH 氧化酶复合物。NADPH 氧化酶可氧化  $\text{NAD(P)H}$  产生 ( $O_2^-$ ), ( $O_2^-$ ) 迅速转变成  $H_2O_2$  [13], 即: 受体  $\rightarrow$  PCK  $\rightarrow$   $\text{Ca}^{2+}$  进入细胞  $\rightarrow$  蛋白激酶  $\rightarrow$  磷酸化质膜 NADPH 氧化酶 (使该酶激活)  $\rightarrow$  产生 ( $O_2^-$ ), ( $O_2^-$ ) 进一步歧化为  $H_2O_2$ 。

大量的研究表明<sup>[14-17]</sup>,活性氧的积累在抗病性的反应中有如下作用:直接抑制和毒害病原菌;引发寄主膜脂过氧化,导致 HR;促进寄主细胞壁的木质化和细胞壁结构蛋白的交联,使得细胞壁的结构得以增强,是病原菌侵染后植物产生的主要防御反应之一;诱导植保素的合成。植保素(Phytoalexins)是植物受到生物或非生物因子侵袭时在体内合成并积累的一类低分子量抗菌性物质。

该试验结果表明,经西芹种子蒸馏水、乙醇、丙酮浸提液处理黄瓜幼苗后,黄瓜叶片内超氧阴离子( $O_2^-$ )含量和过氧化氢( $H_2O_2$ )含量较对照迅速升高,到后期变化不很明显,有的处理甚至低于对照,说明西芹种子浸提液中的化感物质能够增强黄瓜幼苗的抗病性,而且活性氧的积累作为一种早期反应,可能会带动保护酶活性的激发、植保素的合成、细胞壁的加厚等一系列的抗病防病反应。这与前人的研究结果相一致。

西芹种子浸提液处理后,黄瓜叶片内超氧阴离子、过氧化氢含量在取样前期高于对照,后期低于对照。超氧阴离子含量在各取样期的变化幅度范围为蒸馏水—12.50%~38.52%、乙醇—24.41%~109.46%、丙酮—11.04%~166.10%;过氧化氢含量的变化幅度范围为蒸馏水—36.38%~16.26%、乙醇—35.58%~14.52%、丙酮—34.27%~41.36%。

#### 参考文献

- [1] 孔垂华. 新千年的挑战: 第三届世界植物化感作用大会综述[J]. 应用生态学报, 2003, 14(5): 837-838.
- [2] Babu S, Seetharaman K. Fungitoxic properties of some plant extracts against *Alternaria solani*, the tomato leaf blight pathogen[J]. Journal of Ecotoxicology and Environmental Monitoring, 2000, 10(2): 157-159.
- [3] 林嵩, 翁伯琦. 外来植物化感作用研究综述[J]. 福建农业学报, 2005, 20(3): 202-210.

- [4] 阎飞, 杨振明, 韩丽梅. 植物化感作用及其作用物的研究[J]. 生态学报, 2000, 20(4): 692-696.
- [5] 陈圣宾, 李振基. 外来植物入侵的化感作用机制探讨[J]. 生态科学, 2005, 24(1): 69-74.
- [6] Zacheo G, Zacheo T B. Involvement of superoxide dismutase and superoxide radicals in the susceptibility and resistance of tomato plants to *Meloidogyne incognita* attack [J]. Physiol Mol Plant Pathol, 1988, 32: 313-322.
- [7] 连宾, 王进军, 陆玲. 植物与微生物的化感作用[J]. 南京师范大学学报(自然科学版), 2007, 30(1): 88-95.
- [8] 韩燕, 云兴福. 西芹根水浸提液对黄瓜枯萎病菌的化感作用[J]. 内蒙古农业大学学报, 2007, 28(4): 112-115.
- [9] 曹阳. 西芹腐根及腐根际区物浸提液对黄瓜枯萎病菌化感作用的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2009.
- [10] 贾俊英, 张丽莹, 云兴福. 西芹种子浸提液对黄瓜枯萎病菌化感作用的研究[J]. 生态学杂志, 2011, 30(7): 1473-1478.
- [11] 王爱国, 罗广华. 植物的超氧化物自由基与羟氨反应的定量关系[J]. 植物生理学通讯, 1990, 26(6): 55-57.
- [12] Sergiev I, Alexieva V, Karanov E. Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plant [J]. Compt Rend Acad Bulg Sci, 1997, 51(3): 121-124.
- [13] Doke N. Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with incompatible race of *Phytophthora infestans* and to the hyphal cell wall components[J]. Physiol Plant Pathol, 1983(23): 245-249.
- [14] Devlin W S, Gustine D L. Involvement of the oxidative burst in Phytoalexin accumulation and the hypersensitive reaction[J]. Plant Physiol, 1992, 100: 1189-1195.
- [15] Orlandi E W, Mock N M, Baker C J. The elicitation and signal transduction pathways involved in the two-phased active oxygen response during Plant/bacteria interactions[J]. Cell Biochem, 1995, 21: 489-495.
- [16] Glazener J A, Orlandi E W, Baker C J. The active oxygen response of cell suspensions to incompatible bacteria is not sufficient to cause hypersensitive cell death [J]. Plant Physiol, 1996, 110: 759-763.
- [17] 邱金龙, 金巧铃, 王钧. 活性氧与植物抗病反应[J]. 植物生理学通讯, 1998, 34(1): 56-61.

## Study of Allelopathy Mechanism of Extracts of Parsley Seed on *Fusarium oxysporum* F SP. *cucumeris*

JIA Jun-ying<sup>1</sup>, YUN Xing-fu<sup>2</sup>, DU Xiao-yan<sup>1</sup>

(1. College of Agriculture, Inner Mongolia University for the Nationalities, Tongliao, Inner Mongolia 028000; 2. College of Agronomy, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot, Inner Mongolia 010019)

**Abstract:** Distilled water, ethanol and acetone were used as impregment to obtain extract from the parsley seed. The extract was applied to the root of cucumber twice when first euphylla reached 5 cm wide and then the leaves were tested for content of superoxide anion and peroxide at different growing stages. The results showed that the content of superoxide anion and peroxide were higher than that of the control at early days and lower at later stage after treatment with extracts. The content of ( $O_2^-$ ) was higher than that of the control from -12.50% to 38.52% with distilled water extracts, -24.41% to 109.46% with ethanol extracts; -11.04% to 166.10% with acetone extracts. The content of  $H_2O_2$  were higher than the control from -36.38% to 16.26% with distilled water extracts; -35.58% to 14.52% with ethanol extracts; -34.27% to 41.36% with acetone extracts.

**Key words:** parsley seed extracts; *Fusarium oxysporum* F sp. *cucumerinum*; allelopathy mechanism; cucumber leaves; active oxygen