

# 西芹种子浸提液对黄瓜枯萎病菌的化感作用机理研究

贾俊英<sup>1</sup>, 云兴福<sup>2</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 010019)

**摘要:**以美国西芹种子为试材, 采用孢子萌发法和液体培养法, 研究了西芹种子浸提液对黄瓜枯萎病菌菌丝生长、孢子形成和孢子萌发的影响, 以探讨其化感作用机理。结果表明: 经西芹种子各浸提液化感作用后, 黄瓜枯萎病菌菌丝变细, 分叉少; 孢子形成、孢子萌发均受到不同程度的化感抑制作用, 孢子形成抑制率分别为 40.32%、62.26%、60.42%, 孢子萌发抑制率分别为 19.04%、27.28%、28.08%。在电镜下观察各处理病菌孢子膜结构遭到破坏, 胞内结构紊乱, 内含物外渗。

**关键词:**西芹种子浸提液; 黄瓜枯萎病菌; 化感作用; 机理

**中图分类号:**S 436.421.1<sup>+</sup>3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)20-0105-04

由镰刀菌属(*Fusarium*)真菌引起的维管束土传病害现已成为植物的主要病害之一。关于黄瓜枯萎病菌的致病机理, 很多学者<sup>[1-4]</sup>认为分生孢子在幼根表面萌发, 产生菌丝, 菌丝通过根部伤口和侧根分枝处的裂缝和茎基部裂口处侵入, 然后在薄壁细胞间生长扩展, 进入维管束, 堵塞了导管, 同时病菌产生的果胶酶水解植株细胞的中胶层或原果胶物质, 从而导致了水分和养分运输受阻, 最终表现为植株萎蔫。

植物通过其根系分泌物、浸提液、腐解液等方式对微生物菌丝或菌体生长、产孢及孢子萌发有着直接的化感抑制作用。瑞香狼毒萃取物对稻瘟病菌的抑菌机理主要是其活性成分通过渗透方式进入细胞, 破坏线粒体, 降解细胞器, 导致细胞不能正常生长代谢, 进而抑制了菌丝生长, 孢子的萌发和生长<sup>[5]</sup>。嫁接茄根系分泌物抑制了黄萎病菌孢子萌发和菌丝生长<sup>[6]</sup>。陈红兵等<sup>[7]</sup>发现, 万寿菊根提取物对西瓜枯萎病菌菌丝生长有明显的抑制作用。黄瓜抗病品种根系分泌物对病原菌孢子萌发、菌丝生长和病原菌生物量都有一定的抑制作用<sup>[8]</sup>。

该实验室前期研究发现西芹种子的蒸馏水、乙醇、丙酮浸提液对黄瓜枯萎病菌有化感抑制效应<sup>[9]</sup>。该试

验在此基础上优选 50 mg/mL 浓度的浸提液, 进一步从对病菌的直接致病作用角度探讨其化感抑制作用机理, 以期将西芹这种广泛栽培的作物开发成一种新型的植物源抑菌剂, 也为今后生物源农药的理论研究和生产实践应用等方面提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试芹菜品种为美国西芹。

种子浸提液制备: 将西芹种子用蒸馏水洗净吸干, 分别用 80% 乙醇、80% 丙酮和蒸馏水 3 种浸提剂按 1:5 g/mL 进行浸提。于常温下振荡浸提 24 h 经无菌过滤器过滤后, 稀释 4 倍(乙醇、丙酮浸提剂浓度为 20%)作为母液, 置 4℃ 冰箱保存备用。

供试菌种黄瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporium* f. sp. *cucumerinum*)由内蒙古农业大学植物病理研究室提供。

菌种制备: 将黄瓜枯萎病菌接种于已灭菌的 PDA 培养基上, 在 25℃ 下培养 1 周, 复壮菌种待用。

### 1.2 试验方法

1.2.1 西芹种子各浸提液处理对黄瓜枯萎病菌菌丝形态结构的影响 平板制备: 选择化感效应最佳浓度的浸提液(浓度为 50 mg/mL), 采用 0.22 μm 微孔滤膜无菌过滤器过滤后分别加入已灭菌的 PDA 培养基, 比例为 1:9 制备平板, 分别以含有 2 mL 浸提剂的平板为对照(CK), 以不加任何物质的平板为空白(总 CK)。接菌培养: 在无菌条件下, 用直径为 0.6 cm 的打孔器打取菌饼若干, 用接种针将菌饼移入上述不同的培养基上, 菌丝一面向下, 每皿 1 块, 放于中央, 在 25℃ 恒温箱中培养,

**第一作者简介:**贾俊英(1973-), 女, 内蒙古通辽人, 博士, 副教授, 现主要从事西芹种子对黄瓜枯萎病菌化感作用的研究等工作。E-mail:jjy509628@163.com

**责任作者:**云兴福(1958-), 男, 硕士, 教授, 博士生导师, 研究方向为高寒地区蔬菜栽培生理。E-mail:yxf5807@163.com

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(30960068); 内蒙古民族大学博士科研启动金资助项目(BS265)。

**收稿日期:**2013-05-15

每个处理重复6次。形态结构观察:培养144 h后用生物学显微镜(松下 WV-CP410/G)观察处理和对照菌丝形态结构的变化<sup>[10]</sup>。

1.2.2 西芹种子各浸提液对黄瓜枯萎病菌孢子形成的影响 将上述培养144 h的各处理和对照菌落,用打孔器( $\phi=0.6$  cm)于距菌落边缘3~4 mm处打取4个菌块,将菌块上的孢子分别洗下,用血球计数板直接计孢子数,每菌块重复计数3次,将12个观察数据平均后作为结果数据<sup>[11]</sup>。

1.2.3 西芹种子各浸提液对黄瓜枯萎病菌孢子萌发的影响 菌悬液制备:将培养144 h的空白(总CK)上的孢子用蒸馏水洗下,并用无菌水稀释至在40倍物镜下每个视野20~30个孢子。采用载玻片萌发法<sup>[12]</sup>于40倍物镜下镜检病原菌孢子萌发情况,以孢子芽管的长度超过孢子直径的一半为已萌发孢子。计算孢子萌发率和孢子萌发抑制率。

1.2.4 透射电镜超微结构观察 液体培养基配制:理查德(Richard)培养基(有改进): $\text{KNO}_3$  (10 g)、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (5 g)、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (2.5 g)、 $\text{FeCl}_2/\text{FeSO}_4$  (0.02 g)、蔗糖50 g、蒸馏水1 000 mL。经121℃湿热灭菌25 min。接种培养:在无菌条件下,用直径为0.6 cm的打孔器在PDA培养基上生长的病菌菌落边缘打孔,用接种针挑取1块菌饼分别移至已经灭菌的30 mL改良的Richard培

养基中,加入3 mL浓度为50 mg/mL的丙酮、乙醇和蒸馏水浸提液作为处理,分别以加入相同浓度的乙醇、丙酮和蒸馏水各3 mL为对照,以不加任何物质的培养基为空白。于25℃恒温振荡培养箱培养144 h后,电子显微镜(日立 H7650)下观察其结构的变化。

### 1.3 数据分析

孢子数=孢子总数平均数/ $80 \times 400 \times 10\ 000 \times$ 稀释倍数,孢子形成抑制率(%)=(对照孢子数-处理孢子数)/对照孢子数 $\times 100\%$ 。孢子萌发率(%)=(孢子萌发数/总孢子数) $\times 100\%$ ,孢子萌发抑制率(%)=(对照孢子萌发数-处理孢子萌发数)/对照孢子萌发数 $\times 100\%$ 。

所得数据均用Excel和SAS软件进行统计分析,用LSD进行方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 西芹种子各浸提液处理对黄瓜枯萎病菌菌丝形态结构的影响

由图1可以看出,经西芹各浸提液(50 mg/mL)处理的黄瓜枯萎病菌菌丝形态与对照有明显差异。处理组黄瓜枯萎病菌的菌丝分枝减少,节间拉长、变细,分生孢子萌发能力减弱,孢子数目少。顶部缢缩,菌丝体胞内物质外渗,内含物变少。而对照菌丝较粗,芽管萌发能力强,内含物丰富,产生孢子多。

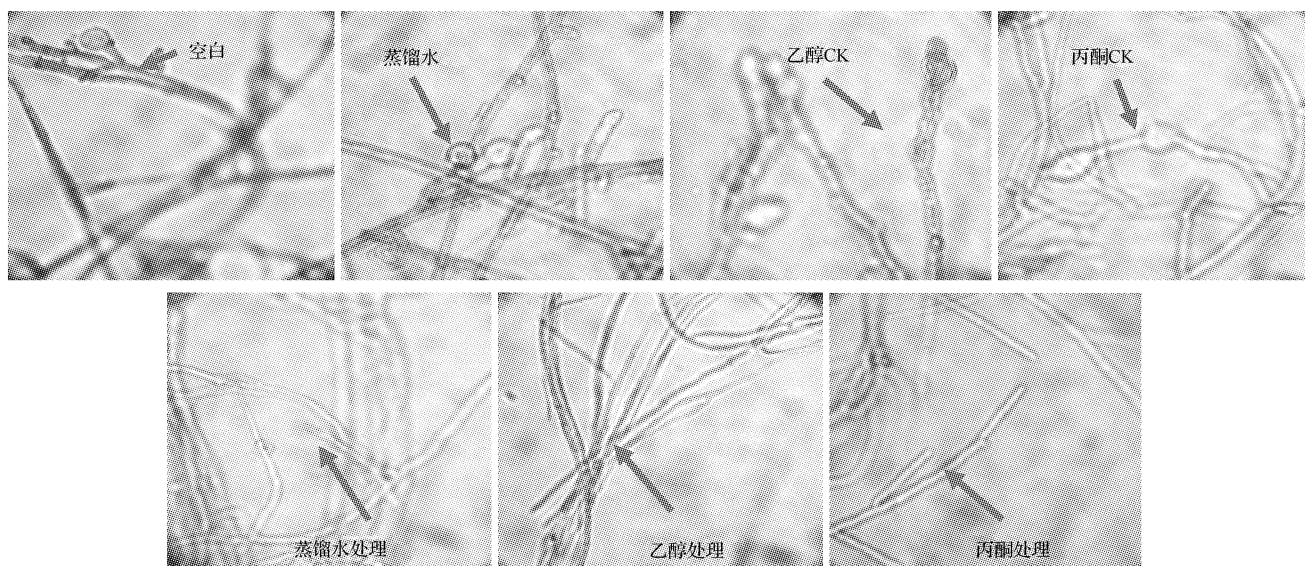


图1 西芹种子各浸提液处理对黄瓜枯萎病菌菌丝结构的影响

Fig. 1 Effect of parsley seeds extracts on mycelium structure of the *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*

### 2.2 西芹种子各浸提液处理对黄瓜枯萎病菌孢子数量的影响

由表1可知,西芹种子各浸提液对黄瓜枯萎病菌孢子的形成具有明显的抑制作用,蒸馏水、乙醇、丙酮浸提

液处理后黄瓜枯萎病菌孢子数分别为 $1.85 \times 10^6$ 个、 $1.00 \times 10^6$ 个、 $0.95 \times 10^6$ 个;孢子形成抑制率分别为40.32%、62.26%、60.42%,3种浸提液对黄瓜枯萎病菌孢子形成的影响都达到了极显著水平( $P < 0.01$ )。



表 1 西芹种子各浸提液处理对  
黄瓜枯萎病菌孢子数量的影响

Table 1 Effect of treated with the extracts of parsley seeds on  
spores number of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*

处理	孢子数量/ $10^6$ 个	孢子形成抑制率/%	F value	Pr>F
空白	3.25	—	—	—
蒸馏水 CK	3.10	—	—	—
蒸馏水处理	1.85	40.32	110.30	0.0005
乙醇 CK	2.65	—	—	—
乙醇处理	1.00	62.26	155.60	0.0002
丙酮 CK	2.40	—	—	—
丙酮处理	0.95	60.42	97.04	0.0006

注:  $P<0.05$  表示差异显著,  $P<0.01$  表示差异极显著。下同。

### 2.3 西芹种子各浸提液处理对黄瓜枯萎病菌孢子萌发的影响

由表 2 可知,西芹种子各浸提液对黄瓜枯萎病菌孢子的萌发具有较强的抑制效果,且不同浸提剂作用效果不同。蒸馏水、乙醇、丙酮浸提液作用后,黄瓜枯萎病菌孢子萌发率分别为 70.00%、57.29%、53.33%,孢子萌发抑制率分别为 19.04%、27.28%、28.08%。3 种浸提液对黄瓜枯萎病菌孢子萌发的抑制都达到了极显著水平( $P<0.01$ )。

表 2 西芹种子各浸提液处理对  
黄瓜枯萎病菌孢子萌发率的影响

Table 2 Effect of treated with the extracts of parsley seeds on  
spore germination rate of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*

处理	孢子萌发率/%	孢子萌发抑制率/%	F value	Pr>F
空白	88.00	—	—	—
蒸馏水 CK	86.46	—	—	—
蒸馏水处理	70.00	19.04	14.11	0.0056
乙醇 CK	78.79	—	—	—
乙醇处理	57.29	27.28	39.28	0.0002
丙酮 CK	74.16	—	—	—
丙酮处理	53.33	28.08	17.72	0.0030

### 2.4 透射电镜超微结构观察

在透射电镜下观察发现,正常生长的黄瓜枯萎病菌呈椭圆形或近圆形,结构规整,清晰,细胞质均匀,分布有序,表明菌丝生长状态良好(图 2);在西芹种子蒸馏水浸提液处理后,其孢子的细胞变形,局部膜细胞器降解,原生质体中的物质开始外渗,细胞质固缩。乙醇、丙酮浸提液作用后,其细胞壁完全遭到破坏,细胞膜轮廓不清,胞内原生质大量外泄,细胞内成分紊乱,胞质不均匀。

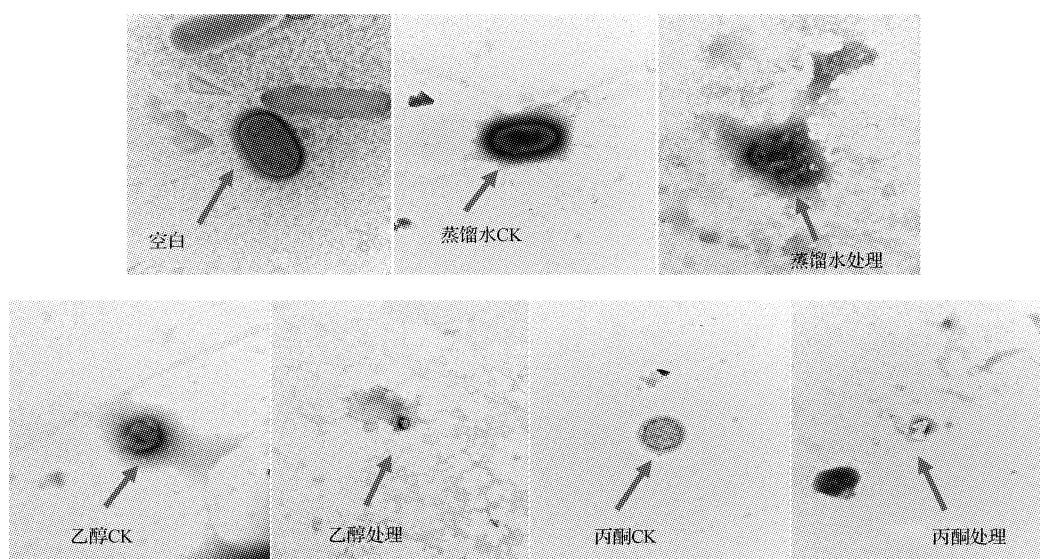


图 2 西芹种子各浸提液处理对黄瓜枯萎病菌孢子超微结构的影响

Fig. 2 Effect of treated with the extracts of parsley seeds on ultra-structure of the *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*

## 3 讨论与结论

该试验通过生物学显微镜观察发现,经西芹种子浸提液化感作用后,黄瓜枯萎病菌菌丝分枝减少,节间拉长、变细。孙延忠等<sup>[12]</sup>在研究武夷菌素对番茄灰霉菌(*Botrytis cinerea*)的作用方式时指出,武夷菌素处理的菌丝分枝增多,有的菌丝顶端有原生质渗漏。这与该研究的结论稍有不同。该试验的研究结果也表明西芹种子各浸提液对黄瓜枯萎病菌的生长具有较强的化感抑制作用,主要是通过抑制孢子的形成和孢子萌发,削

减黄瓜枯萎病菌孢子的形成数量、降低孢子萌发率来实现对黄瓜枯萎病菌的抑制作用。通过电镜观察,菌体膜结构在各浸提液化感物质的作用下逐渐破坏、消融,从结构上也直观的显示出菌体受到了破坏,生长受到抑制。西芹种子浸提液对黄瓜枯萎病菌的化感作用正是由于其削弱了菌体的致病力,从而对寄主起到了保护作用。这就从根本上控制了黄瓜枯萎病菌对寄主的侵入,是一条有效的生物防治途径,也为开发利用西芹种子研制生物农药提供了直接的理论依据。

张新虎等<sup>[13]</sup>在研究苍耳提取物对番茄灰霉病菌的抑制作用及抑菌机理时指出,苍耳提取物对番茄灰霉病菌孢子的形成和孢子萌发表现出极强的抑制作用;经苍耳提取物处理的菌丝变细、分枝增多、节间拉长;分生孢子少且呈畸形,孢子芽管短小。棉花抗黄萎病品种根系分泌物对黄萎病病菌的孢子萌发和菌丝生长也有抑制作用<sup>[14]</sup>。胜红蓟所产生的胜红蓟素及黄酮类物质对柑橘炭疽病菌、水稻纹枯病菌、油菜菌核病菌等多种病原真菌的菌丝生长都有较强的抑制作用<sup>[15]</sup>。也有的学者提出不同的看法,陈红兵等<sup>[7]</sup>认为,万寿菊根的提取物对供试的西瓜枯萎病菌菌丝生长有明显的抑制作用,但对孢子萌发和菌丝形态无明显影响;棉花抗性品种的根系分泌物对土壤中病菌的孢子萌发和菌丝生长有一定抑制作用,而感病品种的根系分泌物能刺激土壤中病菌的生长<sup>[16]</sup>;杨之为等<sup>[17]</sup>研究发现棉花抗病品种根系分泌物对棉花枯萎菌小孢子萌发没有显著影响,但对病菌菌丝的生长,厚垣孢子的形成和萌发的抑制作用较为明显。该研究表明,西芹种子浸提液对黄瓜枯萎病菌孢子的萌发和产生都有较强的抑制作用,这与大多数的研究结果相一致,个别不同的报道说明化感物质对于病原菌的化感效应,可能与化感物质的不同和病原菌所属种类有关,具体原因还有待进一步试验证明。

该试验结果表明,黄瓜枯萎病菌经西芹种子各浸提液化感作用后,黄瓜枯萎病菌菌丝变细,分叉少。孢子形成、孢子萌发均受到不同程度的化感抑制作用,孢子形成抑制率分别为 40.32%、62.26%、60.42%,孢子萌发抑制率分别为 19.04%、27.28%、28.08%。在电镜下观察各处理病菌孢子膜结构遭到破坏,胞内结构紊乱,内含物外渗。

## 参考文献

- [1] Dimond A E. 导管萎蔫病综合症状的生物物理和生物化学[M]. 植物病理学译丛(三),1988.
- [2] 马国斌,林德佩,王叶筠,等. 西瓜枯萎病菌镰刀菌酸对西瓜苗作用机制的初步探讨[J]. 植物病理学报,2000,30(4):373.
- [3] 张显. 西瓜枯萎病抗病性机制的研究[J]. 西北农业大学学报,1989,17(4):29-34.
- [4] Davis D. Carbohydrate specificity for fusaric acid synthesis[J]. Phytopathology,1970,60:111-113.
- [5] 梁海英,陶科,张新刚,等. 瑞香狼毒对稻瘟病菌的抑制活性及其机理的初步研究[J]. 四川大学学报,2008,45(2):446-450.
- [6] Wang R H, Zhou B L, Zhang F L, et al. Allelopathic effects of root extracts of eggplants on *Verticillium wilt*(*Verticillium dahliae*) [J]. Allelopathy Journal,2005,15(1):75-84.
- [7] 陈红兵,王金胜,张作刚,等. 万寿菊根的提取物对西瓜枯萎病反应的抗性研究[J]. 植物病理学,2003,33(5):439-443.
- [8] 韩雪,潘凯,吴凤芝. 不同抗性黄瓜品种根系分泌物对枯萎病原菌的影响[J]. 中国蔬菜,2006(5):13-15.
- [9] 贾俊英,张丽莹,云兴福. 西芹种子浸提液对黄瓜枯萎病菌的化感作用[J]. 生态学杂志,2011,30(7):1473-1478.
- [10] 方中达. 植病研究法[M]. 3版. 北京:中国农业出版社,1998.
- [11] 慕立义. 植物化学保护研究方法[M]. 北京:中国农业出版社,1991.
- [12] 孙延忠,曾洪梅,石义萍,等. 武夷菌素对番茄灰霉菌的作用方式[J]. 植物病理学报,2003,33(5):434-438.
- [13] 张新虎,何静,沈慧敏. 苍耳提取物对番茄灰霉病菌的抑制作用及抑菌机理初探[J]. 草业学报,2008,17(3):99-104.
- [14] 袁虹霞,李洪连,房卫平,等. 棉花不同抗性品种根系分泌物分析及其对黄萎病菌的影响[J]. 植物病理学报,2002,32(2):127-131.
- [15] 孔垂华,黄寿山,胡飞. 胜红蓟化感作用研究Ⅴ. 挥发油对真菌、昆虫和植物的生物活性及其化学成份[J]. 生态学报,2001(21):584-587.
- [16] Li H L, Fang W P. Mechanism of biochemistry for anti-yellow dwarf of cotton[J]. Effect of exudates of different anti-prosoerties sort on virus and analysis of ammonia acids[J]. Chem Ecol,1998(2):177-180.
- [17] 杨之为,王汝贤,高艳卫. 不同棉花品种根系分泌物对棉花枯萎病的影响[J]. 中国农业科学,1995,28(1):87-89.

## Study on Allelopathy Mechanism of the Extract Solution of Parsley Seeds on *Fusarium oxysporium* f. sp. *cucumeris*

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

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

**Abstract:** Taking American parsley seeds as test material, the effect of the extracts solution of parsley seeds on the mycelium growth, spore formation and spore germination of *Fusarium oxysporium* f. sp. *cucumeris* were studied using spore germination and spore suspension liquid method, to discuss the allelopathy mechanism. The results showed that the mycelium of *Fusarium oxysporium* f. sp. *cucumerinum* was thinner and less forked after treated with three parsley seeds extraction (distilled water, ethanol and acetone). The spore formation and spore germination were allelopathic inhibited differently after treated, the inhibition rates of spore formation were 40.32%, 62.26%, 60.42%, and the inhibition rates of spore germination were 19.04%, 27.28%, 28.08%. Through the electron microscopy observation, the structure of membranes of *Fusarium oxysporium* f. sp. *cucumeris*, spores were destructed by three parsley seeds extraction treatment, the intracellular structural was disordered and the contents exosmosed.

**Key words:** extracts solution of parsley seed; *Fusarium oxysporium* f. sp. *cucumerinum*; allelopathy; mechanism