

西芹鲜根丙酮浸提液化感物质 分离及其对黄瓜枯萎病菌的化感作用

苏 荣¹, 郝 娟², 秦立金³, 云兴福¹

(1. 内蒙古农业大学 农学院, 内蒙古 呼和浩特 010019; 2. 内蒙古阿拉善盟农畜产品质量检测中心, 内蒙古 阿拉善左旗 750306;
3. 赤峰学院 生命科学学院, 内蒙古 赤峰 024000)

摘 要:以西芹鲜根为试材,采用丙酮浸提法,分离了西芹鲜根丙酮浸提液中的化感物质,并研究了化感物质对黄瓜枯萎病菌的抑制作用。结果表明:第5次层析抑制效果最佳的4个流分分别是 RA32462、RA33444、RA98898、RA910664,其抑制率与丙酮对照相比分别提高了 33.92%、35.80%、31.11%、32.15%。第6次层析抑制效果最佳的4个流分分别是 RA324625、RA334448、RA988981、RA9106643,其抑制率与丙酮对照相比分别提高了 35.10%、26.48%、34.06%、28.76%。通过对第6次层析的4个最佳流分的丙酮浸提物进行 GC-MS 检测,共鉴定出酸类、酯类、酚类和烷烃类共 4 类 14 种具有化感抑制作用的物质。

关键词:西芹鲜根;丙酮浸提物;黄瓜枯萎病菌;化感作用;化感物质

中图分类号:S 436.421. +3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)21-0120-05

黄瓜枯萎病是由半知菌亚门尖孢镰孢属黄瓜专化型真菌 (*Fusarium oxysporum* (Schl.) f. sp. *cucumerinum* Owen.) 侵染引起的维管束病害,是影响黄瓜生产的主要病害之一^[1]。目前,黄瓜生产上主要使用农药和嫁接等方法来防控黄瓜枯萎病,但农药的使用效果甚微,嫁接也因管理繁琐难以推广^[2],而化感作用对于防控植物病菌既安全又有效,因而具有广阔的应用与发展空间^[3]。化感作用是指植物或微生物的代谢分泌物对环境中植物或微生物产生有利或不利的作^[4],因其不对环境产生污染而受到研究者的重视。

该试验在前期试验的基础上,以西芹鲜根丙酮浸提液第4次层析得到的最佳流分为试材,采用柱层析法进行第5次和第6次柱层析^[5-6],并将第6次层析得到的最佳流分送到中国检验检疫科学研究院使用气相色谱-质

谱仪(Gas Chromatograph-Mass Spectrometer, GC-MS)进行物质分离,旨在对西芹鲜根丙酮浸提液中具有化感作用的物质进行进一步分离纯化,并为以后黄瓜枯萎病的绿色、生态防控奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试西芹品种为美国西芹,购于当地市场;黄瓜枯萎病菌由中国农业科学院蔬菜花卉研究所植物病理研究室提供。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种扩繁 参照白淑兰等^[7]的方法,将黄瓜枯萎病菌接种在 PDA 培养基上,25℃恒温培养 144 h 后,保存在 4℃冰箱中。

1.2.2 西芹鲜根丙酮浸提液的制备 参照李蕾等^[8]试验方法。

1.2.3 第5次层析物的制备 用第4次层析得到的最佳流分使用蒸馏水定容到 50 mL 进行第5次层析^[6],同样收集流分 10 份,编号(RA1~RA10, RA 代表西芹鲜根丙酮浸提液),并且进行化感作用检测^[9]。第6次层析物的制备方法同上。

1.2.4 西芹鲜根丙酮浸提液第5次层析及其化感作用检测 将第5次层析得到的 10 个流分各 2 mL 与 18 mL

第一作者简介:苏荣(1992-),女,硕士研究生,研究方向为高寒地区蔬菜栽培与生理。E-mail:1570371884@qq.com.

责任作者:云兴福(1958-),男,回族,教授,博士生导师,现主要从事高寒地区蔬菜栽培与生理等研究工作。E-mail:yx5807@163.com.

基金项目:国家农业科技成果转化资金资助项目(2014GB2A400716);内蒙古自治区应用技术与开发基金资助项目(20150136)。

收稿日期:2016-08-04

培养基混合均匀倒入培养皿中,5次重复并做好标记,将接好菌种的培养皿 25℃ 恒温培养 24 h 后,使用“十字交叉法”测量菌落直径^[10],每次测量间隔时间相同并记录,直到空白培养皿长满结束测量。第 6 次层析及其化感作用检测方法同上。菌落直径(cm)=测量菌落直径平均值-0.6,化感效果(%)=(对照菌落直径-处理菌落直径)/对照菌落直径×100。

1.3 数据分析

使用 Excel 及 SAS 软件进行数据处理分析,并且进行 5%水平的多重极差检验。

2 结果与分析

2.1 西芹鲜根丙酮浸提液层析分离及化感效果检测

2.1.1 第 5 次层析最佳流分化感效果 如图 1、2 所示,西芹鲜根丙酮浸提液第 5 次层析得到的化感抑制效果最佳的 4 个流分分别是 RA32462、RA33444、RA98898、RA910664,其抑制率与 CK(空白对照)相比分别提高了 38.74%、38.91%、43.58%、40.86%;与 ACK(丙酮对照)相比分别提高了 33.92%、35.80%、31.11%、32.15%。

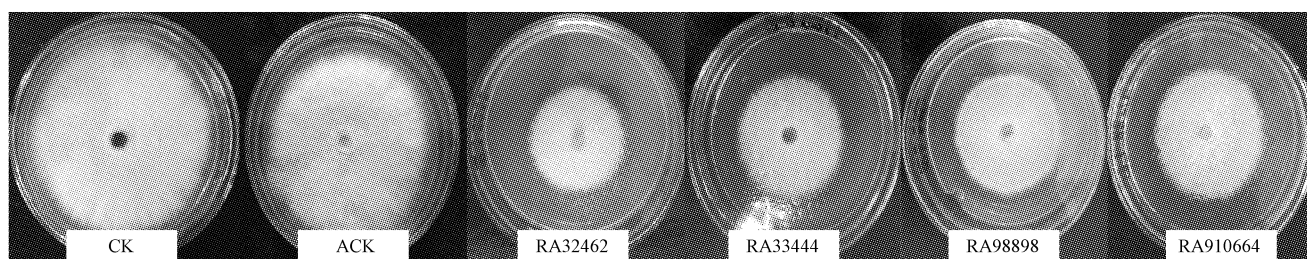


图 1 第 5 次层析最佳流分化感效果

Fig. 1 Allelopathic effects of the best fractions selected by the 5th extract

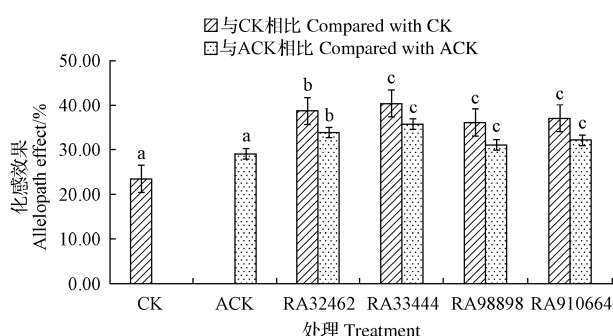


图 2 第 5 次层析最佳流分化感效果

Fig. 2 Allelopathic effects of the best fractions selected by the 5th extracts

2.1.2 第 6 次层析最佳流分化感效果 如图 3、4 所示,西芹鲜根丙酮浸提液第 6 次层析得到的化感抑制效果

最佳的 4 个流分分别是 RA324625、RA334448、RA988981 和 RA9106643,各流分抑制率与 CK(空白对照)相比分别提高了 43.06%、35.5%、42.15% 和 37.5%;与 ACK(丙酮对照)相比分别提高了 35.10%、26.48%、34.06%、28.76%。

2.2 西芹鲜根丙酮浸提液第 6 次层析最佳流分的 GC-MS 检测

在检测出的特异吸收峰中(图 5~9),得到有机酸、酚、酯、烷烃共 4 类 14 种化感物质。其中酚类物质有 3 种:对叔戊基苯酚、对特辛基苯酚、2,6-二叔丁基对甲酚;酯类 3 种:14-甲基十五烷酸甲酯、棕榈酸甲酯、邻苯二甲酸二甲酯;酸类 2 种:棕榈酸、硬脂酸;烷烃类 6 种:二十七烷、二十八烷、二十一烷、二十三烷、二十四烷、四十四烷。

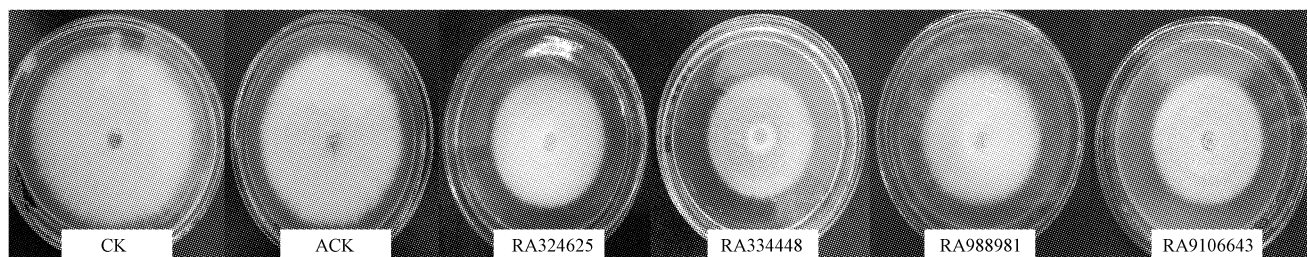


图 3 第 6 次层析最佳流分化感效果

Fig. 3 Allelopathic effects of the best fractions selected by the 6th extract

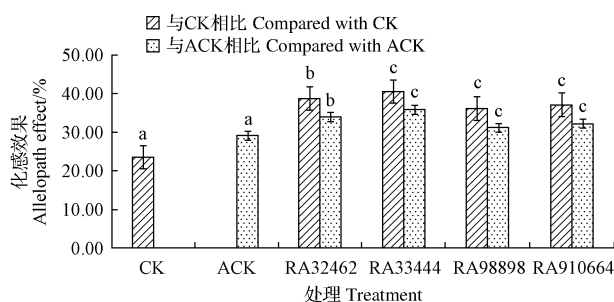


图4 第6次层析最佳流分化感效果

Fig. 4 Allelopathic effects of the best fractions selected by the 6th extract

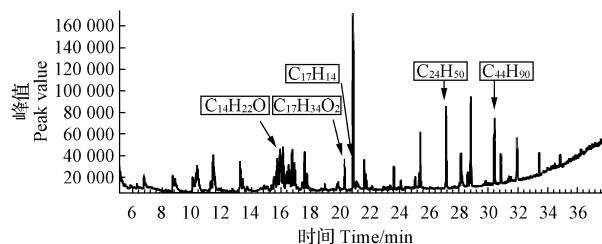


图7 第6次层析流分 RA324625 GC-MS 图谱

Fig. 7 GC-MS spectrums of RA324625 selected by the 6th extract

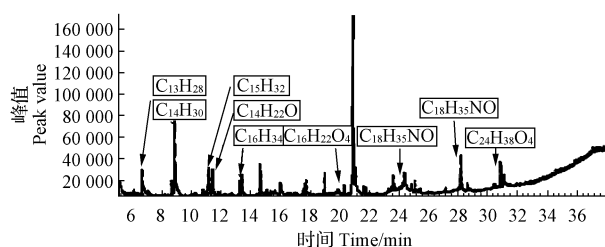


图5 CK 对照的 GC-MS 图谱

Fig. 5 GC-MS spectrums of acetone

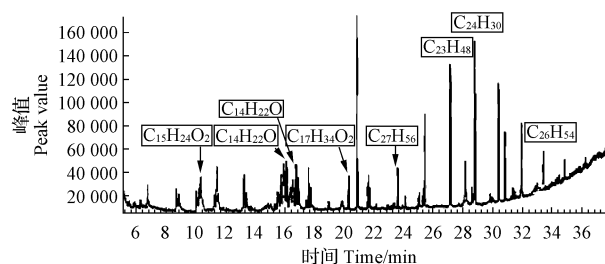


图8 第6次层析流分 RA988981 GC-MS 图谱

Fig. 8 GC-MS spectrums of RA988981 selected by the 6th extract

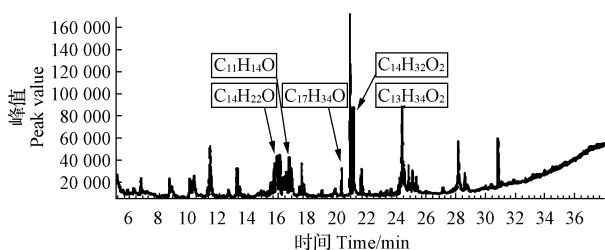


图6 第6次层析流分 RA334448 GC-MS 图谱

Fig. 6 GC-MS spectrums of RA334448 selected by the 6th extract

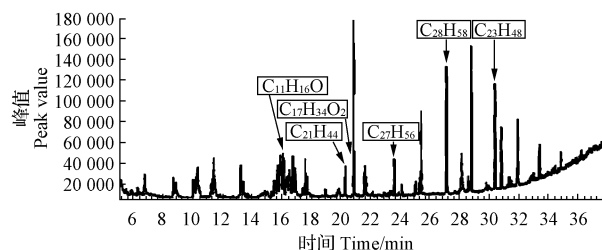


图9 第6次层析流分 RA9106643 GC-MS 图谱

Fig. 9 GC-MS spectrums of RA9106643 selected by the 6th extract

表1 西芹鲜根丙酮浸提液第6次层析最佳流分 GC-MS 分析结果

Table 1 Analysis of GC-MS results of the best fractions selected by the 6th chromatography from acetone extracts of parsley fresh root

最佳流分 Best fractions	分子量 Molecular weight	名称 Name	分子式 Molecular formula	保留时间 Retention time/min	结构式 Structural formula
	206	对特辛基苯酚 Phenol,4-1,1,3,3-tetramethylbutyl	C ₁₄ H ₂₂ O	15.72	
	164	对叔戊基苯酚 Phenol,4-1,1-dimethylpropyl	C ₁₁ H ₁₆ O	16.74	
RA334448	270	14-甲基十五烷酸甲酯 Pentadecanoic acid,14-methyl, methyl ester	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	20.30	
	256	棕榈酸 n-Hexadecanoic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	21.06	
	284	硬脂酸 Octadecanoic acid	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	24.82	

表 1(续)
Table 1(Continued)

最佳流分 Best fractions	分子量 Molecular weight	名称 Name	分子式 Molecular formular	保留时间 Retention time/min	结构式 Structural formula
RA324625	380	二十七烷 Heptacosane	C ₂₇ H ₅₆	21. 74	
	270	棕榈酸甲酯 Hexadecanoic acid, methyl ester	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	20. 28	
	338	二十四烷 Tetracosane	C ₂₄ H ₅₀	28. 81	
	618	四十四烷 Tetraetracontane	C ₄₄ H ₉₀	31. 94	
	206	对特辛基苯酚 Phenol,4-1,1,3,3-tetramethylbutyl	C ₁₄ H ₂₂ O	15. 95	
RA988981	194	邻苯二甲酸二甲酯 Dimethyl phthalate	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	10. 04	
	220	2,6-二叔丁基对甲酚 Butylated Hydroxytoluene	C ₁₅ H ₂₄ O	11. 24	
	164	对叔戊基苯酚 Phenol,4-1,1-dimethylpropyl	C ₁₁ H ₁₆ O	16. 74	
	324	正二十三烷 Tricosane	C ₂₃ H ₄₈	27. 15	
	338	二十四烷 Tetracosane	C ₂₄ H ₅₀	28. 79	
	206	对特辛基苯酚 Phenol,4-1,1,3,3-tetramethylbutyl	C ₁₄ H ₂₂ O	16. 74	
	270	棕榈酸甲酯 Hexadecanoic acid, methyl ester	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	20. 29	
RA9106643	380	正二十七烷 Heptacosane	C ₂₇ H ₅₆	33. 43	
	380	二十七烷 Heptacosane	C ₂₇ H ₅₆	23. 61	
	394	二十八烷 Octacosane	C ₂₈ H ₅₈	27. 14	
	296	二十一烷 Heneicosane	C ₂₁ H ₄₄	23. 61	
	324	二十三烷 Tricosane	C ₂₃ H ₄₈	30. 15	
	270	14-甲基十五烷酸甲酯 Hexadecanoic acid, methyl ester	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	20. 29	
	164	对叔戊基苯酚 Phenol,4-1,1-dimethylpropyl	C ₁₁ H ₁₆ O	16. 76	
	338	二十四烷 Tetracosane	C ₂₄ H ₅₀	28. 80	

3 讨论

关于化感作用的研究已有很多报道,谢星光等^[11]在酚酸类物质的化感作用研究进展中提到:酚酸类物质作为植物次级代谢产物发挥一定的化感抑制作用。高浓度酚酸类物质对作物有抑制作用,但是在某一临界值下对于植物的生长有促进作用。YE 等^[12]研究表明,酚酸类物质能够通过多种途径对植物产生影响。刘艳霞

等^[13]研究了烟草中苯甲酸和 3-苯丙酸的化感作用,认为高浓度酸能够抑制病原菌的生长。周宝利等^[14]研究辣椒种子时发现己二酸二异丁酯对辣椒枯萎病菌有化感抑制作用;董晓宁等^[15]研究表明,烷烃类物质具有化感作用,但具体某一烷烃的化感作用仍值得进一步探索。该试验在第 6 次层析获得的 4 个最佳流分中鉴定出了 3 种酚类物质,其中叔戊基苯酚、2,6-二叔丁基对甲酚已有报道,饶洪冲等^[16]指出它们是一种很好的杀菌

物,其在较低浓度下仍有杀菌作用,是消毒剂配方的主要杀菌活性成分。邻苯二甲酸二甲酯是该研究检测得到的酯类物质,HEINDEL 等^[17]表明,邻苯二甲酸酯的单酯代谢物具有很强的生物活性,能影响细胞的发生、分化和成熟。周宝利等^[18]在研究棕榈酸对茄子根际土壤微生物组成及微生物量的影响时发现,棕榈酸对茄子黄萎菌有一定的化感抑制作用,并且能显著的改变茄子根际微生物种群结构和微生物量。西芹鲜根丙酮浸提液对黄瓜枯萎病菌的化感抑制作用今后仍值得进一步研究。

参考文献

- [1] 闫霜,吴洪生,周晓冬,等. 黄瓜枯萎病生物防治研究进展[J]. 山东农业科学,2011(1):86-92.
- [2] 钱程,云兴福,高晓敏,等. 西芹鲜根浸提液作用后黄瓜枯萎病菌弱毒菌株的筛选[J]. 中国生态农业学报,2014,21(5):606-614.
- [3] 王永,陈磊,云兴福,等. 西芹根物质水浸提液二次层析物对黄瓜枯萎病菌的化感作用[J]. 内蒙古农业科技,2013(2):33-35.
- [4] 吕春霞,杨文叔,慕小倩. 植物化感作用及其在杂草防治中的应用[J]. 陕西农业科学,2002(12):18-20.
- [5] 郝静,高晓敏,马立国,等. 西芹根物质四次醇层物对黄瓜枯萎病菌的化感作用[J]. 内蒙古农业大学学报(自然科学版),2015,36(3):26-32.
- [6] 高晓敏,王琚钢,李杰,等. 西芹鲜根丙酮浸提物层析流分对黄瓜枯萎病菌的化感作用以及化感物质鉴定[J]. 中国生态农业学报,2014,22(11):1364-1371.
- [7] 白淑兰,阎伟,胡永健. 菌根研究及内蒙古大青山外生菌根资源[M]. 呼和浩特:内蒙古人民出版社,2011.
- [8] 李蕾,云兴福,陈磊. 西芹根物质丙酮浸提液二次层析物对黄瓜枯萎病菌的化感作用[J]. 内蒙古大学学报(自然科学版),2012,43(6):639-644.
- [9] 高晓敏,王琚钢,马立国,等. 尖孢镰刀菌致病机理和化感作用研究进展[J]. 微生物学通报,2014,41(10):2143-2148.
- [10] 魏彦梅. 西芹鲜根及根际区物浸提液对黄瓜枯萎病菌化感作用机理的研究-浸提液处理后黄瓜叶片内防御酶活性的变化[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2012.
- [11] 谢星光,陈晏,卜元卿,等. 酚酸类物质的化感作用研究进展[J]. 生态学报,2014,53(77):6417-6428.
- [12] YE S F, YU J Q, PENG Y H, et al. Incidence of *Fusarium* wilt in *Cucumis sativus* L., is promoted by cinnamic acid, an autotoxin in root exudates[J]. Plant and Soil, 2004, 263(1):143-150.
- [13] 刘艳霞,李想,蔡刘体,等. 烟草根系分泌物酚酸类物质的鉴定及其对根际微生物的影响[J]. 植物营养与肥料学报,2016,22(2):418-428.
- [14] 周宝利,张健,刘娜,等. 己二酸二异丁酯对辣椒种子萌发及枯萎菌的化感效应[J]. 生态学杂志,2009,28(11):2273-2278.
- [15] 董晓宁,高承芳,张晓佩,等. 多花黑麦草根系抑草潜力评价及其化感物质分析[J]. 草业学报,2013,22(4):61-68.
- [16] 饶洪冲,段琰,朱征宇. 苯酚消毒剂中邻苯基苯酚和对叔戊基苯酚的高效液相色谱测定法[J]. 医药病理学报,2013,8(2):46-47.
- [17] HEINDEL J J, POWELL C J. Phthalate ester effects on rat Sertoli cell function *in vitro*: Effects of phthalate side chain and age of animal[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 1992, 115:116-123.
- [18] 周宝利,韩琳,尹玉玲,等. 化感物质棕榈酸对茄子根际土壤微生物组成及微生物量的影响[J]. 沈阳农业大学学报,2010,41(3):275-278.

Allelochemicals Isolation of Acetone Extracts From Fresh Parsley Root and Allelopathic Effect on *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumnerinum*

SU Rong¹, HAO Juan², QIN Lijin³, YUN Xingfu¹

(1. Agricultural College, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010019; 2. Alax Banner of Inner Mongolia Livestock Products Quality Inspection Center, Alax Banner, Inner Mongolia 750306; 3. Life Science Department, Chifeng College, Chifeng, Inner Mongolia 024000)

Abstract: In this experiment, acetone extracts from fresh parsley roots were examined after the 5th and 6th cycles purification in column chromatography. The various column fractions were detected with *F. oxysporum* f. sp. *cucumnerinum*. In terms of allelopathic inhibition effect and identified allelochemicals the experiment screened the best fractions of the 6th chromatography using GC-MS. Four best fractions were selected by the 5th extracts. They were RA32462, RA33444, RA98898, RA910664. The allelopathy inhibition effects compared with CK increased 33.92%, 35.80%, 31.11% and 32.15% respectively. And four best fractions were selected by the 6th extracts, they were RA324625, RA334448, RA988981, RA9106643. The allelopathic inhibition effects compared with CK increased 35.10%, 26.48%, 34.06%, 28.76% respectively. There were 14 allelochemicals in four kinds which included acids, esters, phenols and alkanes were identified by GC-MS detection.

Keywords: fresh parsley root; acetone extracts; *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumnerinum*; allelopathy; allelochemicals