

土荆芥挥发油对灰葡萄孢熏蒸抑制的机理分析

Analysis of the fumigation inhibition mechanism of essential oil from *Chenopodium ambrosioides* against the *Botrytis cinerea*

陈利军* 智亚楠 王春生 陈金珠 金银利 陈月华

(信阳农林学院农学院, 河南 信阳 464000)

CHEN Lijun* ZHI Yanan WANG Chunsheng CHEN Jinzhu JIN Yinli CHEN Yuehua

(Agriculture College, Xinyang Agriculture and Forestry University, Xinyang 464000, Henan Province, China)

挥发物因分子量小、易挥发、能在空气和土壤中自由扩散,在植物病害防治中可通过熏蒸方式防治温室作物病害、土传病害、果蔬采后病害等,具有独特的应用价值(陈利军等,2016)。土荆芥 *Chenopodium ambrosioides* 挥发油对植物病原真菌有明显的抑制作用,且其熏蒸抑菌效果优于触杀(陈利军等,2015),开发应用潜力巨大。目前,关于土荆芥挥发油对植物病原真菌抑制机制的研究较少。本研究以农业生产上重要的植物病原真菌灰葡萄孢 *Botrytis cinerea* 为对象,从细胞内含物、核酸类物质和蛋白质的外渗等方面分析土荆芥挥发油的熏蒸作用对细胞膜通透性的影响,观察土荆芥挥发油的熏蒸作用机制,以期对土荆芥挥发油的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试病原菌及培养基:灰葡萄孢由信阳农林学院植物病理实验室保存并提供。土荆芥挥发油本课题组自制并提供。马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基:马铃薯 200 g、葡萄糖 18 g、琼脂 17 g、蒸馏水 1 L;不加琼脂即为马铃薯葡萄糖(potato dextrose broth, PDB)培养基。

试剂及仪器:电镜用钨酸、Spurr 包埋剂,美国 SPI-CHEM 公司;其余试剂为国产分析纯。SU-8010 型扫描电镜、H-7650 型透射电镜,日本 Hitachi 公司;UB103i 显微镜,重庆澳浦光电技术有限公司;Bante 901 型电导率仪,上海般特仪器有限公司;UV-1100 型分光光度计,上海美普达仪器有限公司。

1.2 方法

土荆芥挥发油熏蒸作用对灰葡萄孢细胞膜通透性影响的测定:将灰葡萄孢接至 PDA 培养基中于 25℃ 恒温培养 4 d,沿菌落边缘打取直径 5 mm 的菌

饼,取 5 块菌饼接种至 PDB 培养基中,25℃、120 r/min 振荡培养 7 d 后过滤收集菌丝,用无菌去离子水洗涤 3 次,真空抽滤后,精确称取鲜重 3 g 菌丝置于含 100 mL 无菌去离子水的 230 mL 组培瓶中。在组培瓶瓶盖内放置 3 片直径为 11 mm 的灭菌圆形滤纸片,滤纸片上滴加土荆芥挥发油,拧紧瓶盖后用封口膜密封,25℃、120 r/min 振荡培养,试验设 2 个处理,挥发油浓度为 17 μL/L 和 61 μL/L,以滤纸片不滴加挥发油为对照。重复 3 次。分别在培养 0、24、48、72、96、120、144、168 h 测定灰葡萄孢细胞内含物、核酸类物质和蛋白质外渗的情况。采用电导率法测定细胞内含物外渗情况,根据测定结果计算相对电导率,相对电导率=($C_t - C_0$)/ $C_0 \times 100\%$,其中 C_t 表示某时刻电导率值; C_0 表示 0 h 电导率值。采用吸光度法测定细胞核酸类物质和蛋白质外渗的情况,取 4 mL 上述处理培养液,4℃、13 000 r/min 冷冻离心 20 min,测定波长为 260 nm 和 280 nm 时上清液吸光度 OD 值,分别记为 $A_{260\text{ nm}}$ 和 $A_{280\text{ nm}}$ 。

对灰葡萄孢熏蒸抑制作用的观察:将灰葡萄孢在培养皿中培养 36 h,然后在皿盖上放置 1 片灭菌滤纸,滤纸片上滴加土荆芥挥发油,封口膜密封后,25℃ 倒置培养。设皿内挥发油浓度为 67、133、200 μL/L 浓度,以滤纸片不滴加挥发油为对照。重复 3 次。24 h 后观察并记录菌落形态变化;通过光学显微镜和扫描电镜观察菌落边缘菌丝形态,每处理观察 9 个视野;利用透射电镜观察菌丝细胞结构。

2 结果与分析

2.1 对灰葡萄孢细胞内含物外渗的影响

相对电导率的变化可反应细胞膜通透性的变化。17 μL/L 和 61 μL/L 土荆芥挥发油熏蒸处理后,细胞外渗物相对电导率明显高于对照组,并随时间

推移均呈上升趋势。熏蒸处理 24 h 后, 61 $\mu\text{L/L}$ 处理的细胞外渗物相对电导率达 168.43%, 明显高于 17 $\mu\text{L/L}$ 处理的 55.13% 和对照组的 9.04%。表明土荆芥挥发油熏蒸处理后灰葡萄孢细胞膜的通透性受到破坏, 且浓度越高破坏作用越大。

2.2 对核酸类物质和蛋白质外渗的影响

17 $\mu\text{L/L}$ 和 61 $\mu\text{L/L}$ 土荆芥挥发油熏蒸处理灰葡萄孢后, $A_{260\text{nm}}$ 值随时间推移均呈明显上升趋势, 而对照组的 $A_{260\text{nm}}$ 值变化较小; 61 $\mu\text{L/L}$ 处理 24 h 后, $A_{260\text{nm}}$ 值明显增加, 而 17 $\mu\text{L/L}$ 处理 48 h 后, $A_{260\text{nm}}$ 值大幅度增加。 $A_{280\text{nm}}$ 值呈现与 $A_{260\text{nm}}$ 值相同的规律。表明土荆芥挥发油熏蒸处理可导致灰葡萄孢细胞核酸类物质和蛋白质外渗, 并且随着时间延长外渗量增加; 熏蒸浓度越高, 细胞膜通透性被破坏的越早且越严重。

2.3 对灰葡萄孢熏蒸抑制作用的观察

土荆芥挥发油熏蒸处理灰葡萄孢, 对照组的菌落生长旺盛, 菌丝浓密, 边缘不整齐, 中央开始产孢; 67 $\mu\text{L/L}$ 处理的菌落几乎无生长, 菌丝较稀疏、边缘不整齐, 有产孢但量较少; 133、200 $\mu\text{L/L}$ 处理的菌落无生长, 边缘菌丝稀疏整齐, 且边缘呈现湿润状, 浓度越大湿润状越明显。

光学显微镜观察, 对照组的菌丝粗细均匀、纤细直长, 胞外无外渗物, 分枝正常, 菌丝内部原生质正常; 67 $\mu\text{L/L}$ 处理的菌丝出现肿胀、畸形、分枝增多、分枝不规则等现象, 部分菌丝内部原生质异常, 原生质在菌丝顶端或沿菌丝周围外渗现象较多; 200 $\mu\text{L/L}$ 处理的菌丝内部严重畸变, 部分菌丝断裂, 一些菌丝呈溶解状。

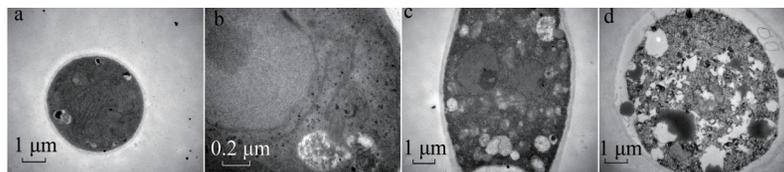
扫描电镜观察, 对照组的菌丝粗细均匀, 表面光

滑, 形态饱满; 67 $\mu\text{L/L}$ 处理的菌丝表面皱缩、粗糙不平, 个别菌丝畸形、塌陷, 较多菌丝顶端畸形、分枝增多; 200 $\mu\text{L/L}$ 处理的多数菌丝干瘪, 断裂的菌丝呈撕裂状。

透射电镜观察灰葡萄孢细胞结构, 对照组细胞饱满, 结构清晰, 细胞壁薄厚均匀、规则, 细胞膜完整光滑, 结构紧密, 细胞质均匀, 细胞器丰富完整, 细胞核、核仁等清晰可见, 且核膜连续完整 (图 1-a); 67 $\mu\text{L/L}$ 处理的菌丝细胞壁增厚、疏松, 细胞膜界限模糊, 出现破裂, 液泡增大, 小液泡和空腔较多, 线粒体畸变, 细胞器界限模糊 (图 1-b); 133 $\mu\text{L/L}$ 处理的细胞质结构破坏明显, 空腔大量增加, 细胞核有消解的趋势, 胞内原生质整体呈消解状 (图 1-c); 200 $\mu\text{L/L}$ 处理的细胞壁显著肿胀、破裂或溶解, 细胞质结构完全被破坏, 空腔大量增加, 细胞器呈溶解状, 胞内原生质整体消解呈碎渣状 (图 1-d)。

3 讨论

本研究中土荆芥挥发油熏蒸处理灰葡萄孢后, 其细胞膜通透性被破坏, 细胞内含物、核酸类物质、蛋白质外渗, 且呈现浓度和处理时间依赖性。由于挥发油的组分复杂, 不同组分作用位点不同, Shao et al. (2013) 研究表明挥发油对细胞的破坏首先作用于细胞膜, 破坏通透性, 进而侵入细胞内部引起细胞器损伤, 影响细胞的生理功能。本研究发现, 随着挥发油浓度增加, 其对菌丝细胞的作用由细胞壁、细胞膜、原生质整体结构逐渐深入到原生质体内部、细胞器、细胞核等, 且破坏程度逐渐加重, 表明土荆芥挥发油作用位点并不单一, 对细胞的破坏是由外到内。说明土荆芥挥发油具有农用生物熏蒸剂开发应用潜力。



a: CK; b: 67 $\mu\text{L/L}$; c: 133 $\mu\text{L/L}$; d: 200 $\mu\text{L/L}$ 。

图 1 透射电镜观察土荆芥挥发油对灰葡萄孢的熏蒸抑制作用

Fig. 1 Fumigation activity of essential oil from *Chenopodium ambrosioides* against *Botrytis cinerea* by TEM

参考文献 (References)

CHEN LJ, GUO SB, TIAN XL, WANG GJ, SHI HZ, QU LJ. 2016. Identification of aroma-producing fungus GS-1 strain and its bio-control efficacy against tomato gray mold. *Journal of Plant Protection*, 43(4): 608-613 (in Chinese) [陈利军, 郭世保, 田雪亮, 王国君, 史洪中, 曲良建. 2016. 产香真菌 GS-1 菌株鉴定及其挥发性物质对番茄灰霉病的生防效果. *植物保护学报*, 43(4): 608-613]

CHEN LJ, ZHI YN, WANG GJ, YIN J, XIONG JW, SHI HZ. 2015.

Antifungal activity and chemical composition analysis of essential oil from fruit of *Chenopodium ambrosioides* L. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 44(1): 70-76 (in Chinese) [陈利军, 智亚楠, 王国君, 尹健, 熊建伟, 史洪中. 2015. 土荆芥果实挥发油的抑菌活性及其组分分析. *河南农业科学*, 44(1): 70-76]

SHAO XF, CHENG S, WANG HF, YU D, MUNGAI C. 2013. The possible mechanism of antifungal action of tea tree oil on *Botrytis cinerea*. *Journal of Applied Microbiology*, 114(6): 1642-1649