

芥菜乙醇提取物对西瓜枯萎病菌的抑菌机制

刘琳 王强 袁仁文 张蕊 王静 范淑英*

(江西农业大学农学院, 南昌 330045)

摘要: 为探究芥菜乙醇提取物对植物病原菌的抑制机理,以西瓜枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* 为指示菌,以最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC) 0.5 g/mL 为基准,设置 0、0.25、0.5 和 1.0 g/mL 共 4 种处理浓度,通过测定菌丝形态结构、菌液电导率、菌体丙二醛含量、细胞壁相关水解酶活性、呼吸代谢途径酶活性、可溶性蛋白含量及还原糖含量等指标的变化分析其抑菌机理。结果显示,1.0 g/mL 芥菜乙醇提取物对西瓜枯萎病菌的处理效果最好,其中,处理后病菌菌液的电导率明显增大,最大可达 1.45 ms/cm,是对照组的 1.57 倍;丙二醛含量达 3.16 mmol/g,为对照组的 2.24 倍;几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶的活性最高,分别为 10.57 U/g 和 14.16 U/g,较对照组分别显著升高了 48.04% 和 17.80%,同时细胞壁降解,使细胞完整性受损;琥珀酸脱氢酶和苹果酸脱氢酶的活性最低,分别为 7.33 U/mg 和 0.28 U/mg,较对照组分别显著下降了 73.02% 和 47.17%;可溶性蛋白和还原糖的含量显著降低,分别为 0.44 mg/g 和 5.34 mg/g,较对照组分别下降了 60.71% 和 56.30%,呼吸能量代谢受阻,抑制菌体生长。表明芥菜乙醇提取物可有效防治西瓜枯萎病。

关键词: 芥菜; 西瓜枯萎病; 抑菌机理

Suppression mechanism of the ethanol extracts from *Brassica juncea* against the pathogen of watermelon *Fusarium wilt*

Liu Lin Wang Qiang Ruan Renwen Zhang Rui Wang Jing Fan Shuying*

(College of Agronomy, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, Jiangxi Province, China)

Abstract: In order to explore the inhibitory mechanism of the extract of *Brassica juncea* against plant pathogenic bacteria, *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* was used as an indicator bacterium, and the minimum inhibitory concentration (MIC) 0.5 g/mL was used as the benchmark to set 0, 0.25, 0.5 and 1.0 g/mL treatments, by measuring the morphology of mycelium, changes in bacterial liquid conductivity, bacterial malondialdehyde content, cell wall-related hydrolase activity, respiratory metabolic pathway enzyme activity, soluble protein content and reducing sugar content to analyze its antibacterial mechanism. The results showed that the conductivity of the bacterial liquid of *F. oxysporum* f. sp. *niveum* after the treatment of the *B. juncea* ethanol extract increased significantly, and the conductivity of the bacterial liquid at the concentration of 1.0 g/mL was up to 1.45 ms/cm, which was 1.57 times the control, and malondialdehyde content reached 3.16 mmol/g, 2.24 times the control. The chitinase and β -1,3-glucanase activities were 10.57 U/g and 14.16 U/g, respectively, which were significantly higher than the control by 48.04% and 17.80%, accompanied by cell wall degradation and impaired cell integrity. The succinate dehydrogenase and malate dehydrogenase activities were 7.33 U/mg and 0.28 U/mg, respectively, which were significantly lower than the control by 73.02% and 47.17%. The contents of

cell contents such as soluble protein, reducing sugar content were significantly reduced to 0.44 mg/g and 5.34 mg/g, decreased by 60.71% and 56.30%, accompanied by blocked respiratory energy metabolism and inhibited cell growth. It indicated that *B. juncea* ethanol extracts could effectively control watermelon *Fusarium* wilt.

Key words: *Brassica juncea*; watermelon *Fusarium* wilt; antifungal mechanism

西瓜枯萎病俗称死秧病,又叫蔓割病、萎蔫病等,是由西瓜尖孢镰刀菌专化型 *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* 引起的一种世界性真菌病害,主要依靠土壤和种子传病,该菌在西瓜的幼苗期、开花期、结果期等各个生育期均可侵染导致发病,尤其在坐果期和膨瓜期发病最重,给西瓜的产量和品质造成了严重影响(Miguel et al., 2004; Dau et al., 2009; 黄春艳等, 2016)。而长期大量使用化学农药防治农作物病虫害,对生态环境和人类健康均造成极大危害(徐红星等, 2017)。从植物中寻找并提取抑菌活性物质已成为解决这一难题的有效途径之一。

研究表明,一些蔬菜植物不仅可为人们提供营养物质,还具有抗氧化、抗癌、调节免疫、降低胆固醇、抗菌等作用(万春鹏等, 2014; 杨春芳等, 2018)。如廖石榴等(2017)测定了茼蒿乙酸乙酯提取物对柑橘溃疡病菌 *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* 的生物活性,测得最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)为 3.68 mg/mL,且对离体接菌的柑橘叶片有很好的防治作用;延永等(2018)通过正交试验得到在以 60% 乙醇为溶剂,料液质量体积比为 1:40,回流 1.5 h 的提取条件下,红薯叶总黄酮提取物对金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 和大肠杆菌 *Escherichia coli* 的抑制效果较好;程道梅等(2011)和刘芳洁(2018)发现紫苏乙醇提取物对细菌、霉菌和真菌等微生物存在明显的抑制作用;Jakatimath et al. (2017)研究结果表明大蒜提取物和洋葱提取物能明显抑制茄子褐纹病菌 *Phomopsis vexans* 的菌丝生长。

本课题组前期研究发现芥菜 *Brassica juncea* 乙醇提取物对西瓜枯萎病菌——西瓜尖孢镰刀菌专化型有较好的抑制效果,并通过试验得到其 MIC 为 0.5 g/mL(未发表数据),但对芥菜乙醇提取物的抑菌机制尚不明确。目前多数研究结果表明,植物提取物对病原菌的抑制途径主要包括破坏菌体细胞壁、增大细胞膜透性、干扰酶系统和影响能量代谢等(陈楚英等, 2016; 周金伟等, 2016; 李晓菲和徐政, 2018)。刘琼等(2016)研究结果表明茼蒿提取物对西瓜枯萎病菌的抑菌机理主要表现在菌体核酸泄

漏、生物量降低、总糖及蛋白质含量下降等方面;李珊珊等(2018)研究发现经茼蒿中提取的绿原酸处理后,西瓜枯萎病菌菌丝干鲜重减少、孢子萌发率降低且细胞膜透性增加。本试验拟在课题组前期研究基础上以芥菜乙醇提取物为试材,测定其对西瓜枯萎病菌多项生理生化指标的影响,分析其作用机理,以期对芥菜的进一步开发利用以及高效、环保、安全的植物源杀菌剂研制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植物及病原菌:待江西农业大学农学院蔬菜基地种植的芥菜品种芥菜笋(茎用芥)成熟后取茎叶,风干后用小型粉碎机制成粉末状样品,过 40 目筛,置于密封袋备用。西瓜枯萎病菌由江西农业大学江西省农业微生物资源开发与利用工程实验室保存并提供。

培养基:马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基:马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 20 g、蒸馏水 1 000 mL, pH 自然;PD 液体培养基:PDA 培养基中不添加琼脂。

试剂与仪器:琥珀酸脱氢酶(succinate dehydrogenase, SDH)活性测定试剂盒、苹果酸脱氢酶(malate dehydrogenase, MDH)活性测定试剂盒,南京建成生物工程研究所;其余试剂均为国产分析纯。XB-K-25 血球计数板,上海市求精生化试剂仪器有限公司;5810R 离心机,德国艾本德公司;HI 2315 电导率仪,意大利哈纳公司;RXZ 智能人工气候箱,宁波东南仪器有限公司;UV-2600 紫外分光光度计,日本岛津公司;IX73 显微镜,日本奥林巴斯公司。

1.2 方法

1.2.1 芥菜乙醇提取物对菌丝形态影响的测定

前期预试验中,用 95% 乙醇、80% 甲醇、80% 丙酮分别对芥菜粉末进行了浸提,发现乙醇提取物效果最好,且 MIC 为 0.5 g/mL(未发表数据),因此后续试验均采用乙醇进行提取。准确称取 10 g 芥菜粉末,加入 10 倍量的 95% 乙醇溶液浸提 24 h,超声波辅助提取 2 h,过滤提取液,于 40~50℃ 条件下旋转

蒸发浓缩至 10 mL,制成浓度为 1.0 g/mL 的芥菜乙醇提取物,本试验设置 0.25 g/mL (1/2MIC)、0.5 g/mL (MIC)、1.0 g/mL (2MIC) 三个浓度,4℃保存备用。

在无菌条件下,将供试西瓜枯萎病菌接种至 PDA 培养基后,置于 28℃ 人工气候箱中恒温暗培养 5 d,待菌种长满平板时,在菌落边缘处打取直径为 8 mm 的菌饼备用。取制备好的菌饼接入含 0.5 g/mL 芥菜乙醇提取物的 PDA 平板中央,以接入不含芥菜乙醇提取物的 PDA 平板为对照,每个处理 3 次重复。置于 28℃ 人工气候箱中暗培养 3 d 后,400 倍显微镜下观察菌丝形态,共观察 12 个视野。

1.2.2 芥菜乙醇提取物对细胞膜影响的测定

根据陈楚英等(2019)方法,在无菌条件下将直径 8 mm 的西瓜枯萎病菌菌饼接种至 PDA 平板上,置于 28℃ 人工气候箱活化 7 d 后,用无菌水将西瓜枯萎病菌菌丝体洗入三角瓶中,用纱布过滤,血球计数板计数,使菌悬液浓度为 1×10^7 CFU/mL。将 1 mL 西瓜枯萎病菌菌悬液接种于 90 mL PD 液体培养基中,于 28℃ 以 180 r/min 摇培 3 d 后,分别加入 10 mL 不同浓度的芥菜乙醇提取物溶液,对照加入相同体积的蒸馏水,并在 1、2、3、4 和 5 h 后取 6 mL 菌液以 4 000 r/min 离心 10 min,用电导率仪测定各处理上清液的电导率,每个处理 3 个平行试验。

无菌条件下将 1 mL 西瓜枯萎病菌菌悬液接种于 90 mL PD 液体培养基中,置于 28℃ 恒温摇床以 180 r/min 培养 3 d 后,分别加入 10 mL 不同浓度的芥菜乙醇提取物溶液,对照加入相同体积的蒸馏水。继续培养 3 d 后,取样,抽滤,收集菌丝,菌丝用无菌水冲洗 3 次,将制备好的菌丝于 -80℃ 保存备用。取菌丝 0.5 g,向其中加入 0.05 mol/L Tris-HCl (pH 7.5) 缓冲液 3 mL,4℃ 冰浴研磨成匀浆后,以 12 000 r/min 冷冻离心 20 min。取上清液即为待测酶液,用于菌体丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、酶活性、可溶性蛋白、还原糖含量的测定。

MDA 含量的测定:采用硫代巴比妥酸法测定(高俊凤,2006)。取 2 mL 上述上清液到试管中,加入 0.5% 硫代巴比妥酸溶液 2 mL,摇匀。将试管放入沸水浴中煮沸 30 min 后,立即将试管取出放入冷水浴中迅速冷却。待溶液冷却后,以 3 000 r/min 离心 15 min。以 0.5% 硫代巴比妥酸溶液为空白对照,分别于 450、532、600 nm 波长下测定其吸光度,并计算 MDA 含量。每个处理 3 次重复。

1.2.3 芥菜乙醇提取物对菌体酶活性影响的测定

几丁质酶活性的测定:参考 Mauch et al. (1984)

方法制得浓度为 2 g/L 的几丁质胶体悬浮液,以几丁质胶体为底物测定几丁质酶活性(Prochazkova et al., 2001; 高俊凤, 2006)。取 2 g/L 胶状几丁质悬浮液 0.5 mL,加入 50 mmol/L 乙酸-乙酸钠缓冲液 (pH 5.2) 0.5 mL、待测酶液 0.5 mL,混合均匀。以经煮沸 5 min 的酶液作为对照。继续在 37℃ 恒温水浴培养 1 h,以释放 *N*-乙酰葡萄糖胺单体。取出后立即加入 0.6 mol/L 四硼酸钾溶液 0.2 mL,并在沸水浴中煮沸 3 min,然后立即将试管取出放入冷水浴中迅速冷却。加入用冰醋酸稀释 5 倍的对二甲基氨基苯甲醛溶液 2 mL,再在 37℃ 恒温水浴培养 20 min 进行显色反应。冷却后于 585 nm 波长下测定其吸光度。每个处理 3 次重复。同时,以 *N*-乙酰氨基葡萄糖制作标准曲线,计算样品中的几丁质酶活性。以每秒钟每克样品 (鲜重) 中酶分解胶状几丁质产生 1 μ mol *N*-乙酰葡萄糖胺为 1 个几丁质酶活性单位。

β -1,3-葡聚糖酶活性的测定 (Mauch et al., 1984; 曹建康等, 2007; Huang et al., 2008):反应体系包括 4 g/L 昆布多糖溶液 100 μ L 和待测酶液 100 μ L,以煮沸 5 min 的酶液作为空白对照。混匀后将反应管置于 37℃ 水浴锅中保温 40 min。然后向反应管中加入蒸馏水 1.8 mL 和二硝基水杨酸 1.5 mL,在沸水浴中加热 3 min。再用蒸馏水将显色的反应液稀释至 25 mL,混匀。测定混合液在 540 nm 波长下的吸光度。每处理 3 次重复。同时以葡萄糖制作标准曲线,计算 β -1,3-葡聚糖酶活性。以每秒钟每克样品 (鲜重) 中酶分解昆布多糖产生 1×10^{-9} mol 葡萄糖为 1 个 β -1,3-葡聚糖酶活性单位。

SDH 活性的测定:操作步骤按照 SDH 活性测定试剂盒说明书进行。将混匀后的样品迅速倒入光径比色皿中,在 600 nm 波长下比色,5 s 时记下吸光度 A_1 ,65 s 时记下吸光度 A_2 ,求出 2 次的吸光度差值 $\Delta A = A_1 - A_2$,每个处理 3 次重复。以每毫克蛋白每分钟使反应体系吸光度降低 0.01 为 1 个 SDH 活性单位。

MDH 活性的测定:操作步骤严格按照 MDH 活性测定试剂盒说明书进行。将混匀后的样品迅速倒入石英比色皿中,在 340 nm 波长下比色,20 s 时记下吸光度 A_3 ,80 s 时再次记下吸光度 A_4 ,求出 2 次的吸光度差值 $\Delta A = A_3 - A_4$,每个处理 3 次重复。以每毫克蛋白每分钟内催化 1 μ mol 底物转变成产物为 1 个 MDH 活性单位。

1.2.4 芥菜乙醇提取物对可溶性蛋白和还原糖影响的测定

可溶性蛋白含量的测定:采用考马斯亮蓝 G-250 法测定 (陈毓荃, 2002)。取考马斯亮蓝 G-250 溶

液 3 mL, 向其中加入待测酶液 0.05 mL。静置 5 min, 于 595 nm 波长下测定其吸光度。同时采用考马斯亮蓝 G-250 法, 以牛血清白蛋白制作标准曲线, 计算样品中可溶性蛋白的含量。

还原糖含量的测定: 取待测酶液 0.5 mL 与 3, 5-二硝基水杨酸 2 mL 混匀后沸水浴 5 min, 自来水冷却后用蒸馏水定容至 25 mL, 于 540 nm 波长下测定其吸光度, 同时以 1.2.3 方法制作葡萄糖标准曲线, 计算样品中还原糖的含量。

1.3 数据分析

利用 SPSS 17.0 软件对试验数据进行统计分析, 应用 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性检验。

采用 Origin 8.1 软件进行数据处理和图形制作。

2 结果与分析

2.1 芥菜乙醇提取物对菌丝形态结构的影响

显微观察发现, 对照组生长的菌丝分枝少、均匀、表面平整且无限延长(图 1-A), 而经芥菜乙醇提取物 0.5 g/mL 浓度处理的菌丝分枝增加、顶端膨大、延伸不规则(图 1-B); 且菌丝出现畸形, 易发生断裂, 导致菌体内含物渗出(图 1-C); 同时, 菌丝变细、缠绕并扭曲, 胞内空白面积增大(图 1-D)。表明芥菜乙醇提取物能有效干扰西瓜枯萎病菌菌丝的生长, 从而达到抑菌的作用。

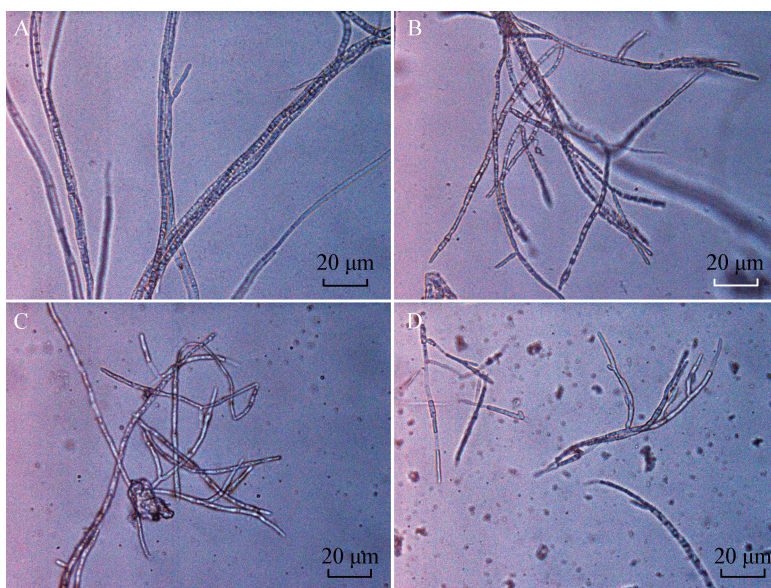


图 1 芥菜乙醇提取物对西瓜枯萎病菌菌丝形态的影响

Fig. 1 Effects of ethanol extracts of *Brassica juncea* on the hyphal morphology of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*

A: 对照; B~D: 提取物浓度为 0.5 g/mL. A: Control; B~D: the extract concentration is 0.5 g/mL.

2.2 芥菜乙醇提取物对菌体细胞膜的影响

芥菜乙醇提取物各浓度处理组的西瓜枯萎病菌菌体电导率随时间的延长大致呈现先增加后逐渐稳定的趋势。在处理 1~5 h 内, 0.25、0.5、1.0 g/mL 芥菜乙醇提取物处理组的电导率均较对照组显著增加。在同一测定时间点, 各处理组的电导率随处理浓度的增加而显著增大。处理 5 h, 1.0 g/mL 处理的电导率达到最大, 为 1.45 ms/cm, 是对照组的 1.57 倍。说明芥菜乙醇提取物能增大西瓜枯萎病菌菌体的细胞膜透性, 对菌体活性有较好的抑制作用(图 2)。

与对照组相比, 经芥菜乙醇提取物处理的西瓜枯萎病菌菌体 MDA 含量均显著升高。0.25、0.5 和 1.0 g/mL 浓度处理后菌体 MDA 含量分别为 1.70、2.34、3.16 mmol/g, 是对照组的 1.21、1.66 和 2.24 倍,

且各浓度处理间差异显著。表明芥菜乙醇提取物处理能使菌体 MDA 含量显著增加, 即菌体的细胞膜脂过氧化程度加剧, 细胞膜系统的完整性被破坏, 对菌体产生一定的伤害作用(表 1)。

2.3 芥菜乙醇提取物对细胞壁相关水解酶的影响

经不同浓度的芥菜乙醇提取物处理后, 菌体内几丁质酶活性均显著升高。0.25、0.5 和 1.0 g/mL 浓度处理后菌体内几丁质酶活性分别为 8.59、9.76、10.57 U/g, 分别较对照组的几丁质酶活性 7.14 U/g 提高了 20.31%、36.69% 和 48.04%。表明芥菜乙醇提取物处理可使西瓜枯萎病菌菌体内几丁质酶活性升高, 导致菌体细胞壁降解, 从而达到抑菌目的(表 1)。

随着芥菜乙醇提取物浓度的增加, 菌体的 β -1,

3-葡聚糖酶活性逐渐升高,且各处理组的该酶活性均较对照组显著升高。0.25、0.5和1.0 g/mL浓度处理组的 β -1,3-葡聚糖酶活性分别为12.53、13.61、14.16 U/g,较对照组的 β -1,3-葡聚糖酶活性12.02 U/g分别显著升高了4.24%、13.23%和17.80%。表明经芥菜乙醇提取物处理后,西瓜枯萎病菌菌体的 β -1,3-葡聚糖酶活性显著升高,能使细胞壁降解,抑制菌丝生长(表1)。

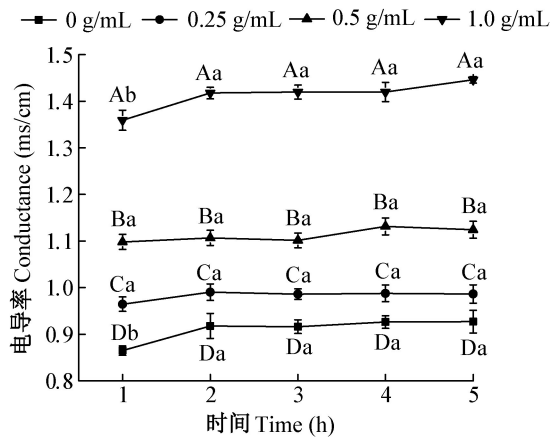


图2 芥菜乙醇提取物对西瓜枯萎病菌细胞膜透性的影响

Fig. 2 Effects of ethanol extracts of *Brassica juncea* on the cell membrane permeability of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*
图中数据为平均数±标准差。不同大、小写字母分别表示同一时间点不同浓度处理间、同一浓度不同时间处理间经LSD法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SD. Different uppercase or lowercase letters indicate significant difference among different concentrations at the same time point or among different times at the same concentration at $P<0.05$ level by LSD test.

表1 芥菜乙醇提取物对西瓜枯萎病菌丙二醛含量、酶活性、可溶性蛋白和还原糖含量的影响

Table 1 Effects of ethanol extracts of *Brassica juncea* on MDA content, enzyme activity, soluble protein and reducing sugar contents of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*

指标 Index	芥菜乙醇提取物浓度 Ethanol extract concentration of <i>B. juncea</i> (g/mL)			
	0	0.25	0.50	1.00
丙二醛含量 Malondialdehyde content (mmol/g)	1.41±0.02 d	1.70±0.06 c	2.34±0.11 b	3.16±0.14 a
几丁质酶活性 Chitinase activity (U/g)	7.14±0.28 d	8.59±0.28 c	9.76±0.48 b	10.57±0.28 a
β -1,3-葡聚糖酶活性 β -1,3-glucanase activity (U/g)	12.02±0.24 d	12.53±0.24 c	13.61±0.31 b	14.16±0.18 a
琥珀酸脱氢酶活性 Succinate dehydrogenase activity (U/mg)	27.17±0.55 a	20.15±0.25 b	15.39±0.65 c	7.33±0.32 d
苹果酸脱氢酶活性 Malate dehydrogenase activity (U/mg)	0.53±0.01 a	0.49±0.02 b	0.40±0.02 c	0.28±0.00 d
可溶性蛋白含量 Soluble protein content (mg/g)	1.12±0.05 a	0.95±0.04 b	0.60±0.02 c	0.44±0.00 d
还原糖含量 Reducing sugar content (mg/g)	12.22±0.29 a	10.30±0.21 b	7.08±0.13 c	5.34±0.11 d

表中数据为平均数±标准差。同行不同小字母表示经LSD法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SD. Different lowercase letters in the same row indicate significant difference at $P<0.05$ level by LSD test.

2.4 芥菜乙醇提取物对呼吸代谢途径酶的影响

经芥菜乙醇提取物处理后,菌体的SDH活性显著降低,且呈现出提取物浓度越高,酶活性越低的趋势。在0.25、0.5和1.0 g/mL浓度处理下,SDH的活性分别为20.15、15.39、7.33 U/mg,分别较对照组的SDH活性27.17 U/mg显著下降了25.84%、43.36%和73.02%。表明芥菜乙醇提取物破坏或抑制了菌体细胞内SDH活性,使整个三羧酸循环受阻,从而抑制病菌生长(表1)。

随着芥菜乙醇提取物浓度的增加,MDH活性不

断降低。0.25、0.5和1.0 g/mL浓度处理组的MDH活性分别为0.49、0.40、0.28 U/mg,分别较对照组显著下降了7.55%、24.53%和47.17%。高浓度的芥菜乙醇提取物能维持菌体更低的MDH活性,说明芥菜乙醇提取物可对西瓜枯萎病菌的细胞造成损害,能有效抑制MDH活性,使得细胞能量代谢受阻,从而抑制菌体的正常生长(表1)。

2.5 芥菜乙醇提取物对可溶性蛋白和还原糖的影响

随着芥菜乙醇提取物浓度的增加,菌体的可溶性蛋白含量呈显著下降趋势。其中对照组的可溶性

蛋白含量最高,为1.12 mg/g,0.25、0.5和1.0 g/mL浓度处理组菌体的可溶性蛋白含量分别为0.95、0.60、0.44 mg/g,较对照组分别显著下降了15.18%、46.43%和60.71%。表明芥菜乙醇提取物中可能含有抑制西瓜枯萎病菌可溶性蛋白质合成的成分,扰乱菌体的生理代谢过程(表1)。

经芥菜乙醇提取物处理后,菌体内的还原糖含量均显著降低。0.25、0.5和1.0 g/mL浓度处理组的还原糖含量分别为10.30、7.08、5.34 mg/g,较对照组的还原糖含量12.22 mg/g显著下降了15.71%、42.06%和56.30%。表明芥菜乙醇提取物可能抑制了西瓜枯萎病菌菌体还原糖的合成,导致还原糖含量下降,从而有效抑制菌丝生长(表1)。

3 讨论

抑菌或杀菌物质对病原菌的作用途径之一是改变其菌丝形态,使菌丝出现畸形、断裂、分枝增加等现象,从而阻碍菌丝的正常生长。赵刚等(2017)研究结果表明韭菜提取物对苹果轮纹病菌 *Botryosphaeria berengeriana* 菌丝生长有显著破坏作用,主要表现为菌丝生长缓慢、菌丝体膨大、畸形、泡状结构增多、细胞壁轮廓模糊;周洁尘等(2015)研究发现经植物提取物处理的降香黄檀炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides* 菌丝出现分枝增多、长度变短且粗细不均、交联、膨胀、严重畸形、菌丝壁不规则等现象。这与本试验中芥菜乙醇提取物使西瓜枯萎病菌菌丝出现分枝增加、顶端膨大、畸形等现象相似。

芥菜乙醇提取物能损伤西瓜枯萎病菌菌体的细胞膜,使细胞膜透性发生改变,菌体内电解质外渗,电导率增大,这与刘琼等(2016)报道茼蒿提取液可导致西瓜枯萎病菌内含物外渗,培养液电导率增加,进而影响西瓜枯萎病菌细胞膜透性的结论基本一致。同时本试验中经芥菜乙醇提取物处理后的西瓜枯萎病菌MDA含量增加,说明膜脂过氧化程度变大,膜系统受损,进一步证实了本试验结论的正确性。许紫峻等(2016)研究结果表明经核桃青皮提取物处理的霉菌细胞膜透性增加,导致菌液电导率增大,MDA含量和电解质外渗率同时达到最大值,证明核桃青皮提取物破坏了霉菌的细胞膜,这与本研究结果一致。

几丁质和 β -1,3-葡聚糖是许多真菌细胞壁的主要结构成分,能水解真菌病原菌的细胞壁成分,使细胞壁破裂,进而抑制真菌病原菌的生长(Nagpure et al., 2014)。王远瑕等(2015)研究结果表明,浓度为

100 mg/L的虎杖提取物处理苹果腐烂病菌 *Valsa mali* 后,菌丝内几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶活性升高,从而导致苹果腐烂病菌细胞壁的降解,抑制菌体生长;李少华等(2015)采用细辛活性物质处理番茄早疫病菌 *Alternaria solani* 后,发现菌体内几丁质酶活性、N-乙酰葡萄糖胺含量均比对照升高,几丁质酶活性升高,几丁质水解加快,而N-乙酰葡萄糖胺是构成几丁质的主要成分,细胞壁组分降解导致细胞壁松弛,原生质破裂,影响菌丝的正常生长。张莉等(2010)研究结果表明,通过损伤接种褐腐病菌 *Monilinia fructicola* 的桃果实经过厚朴提取物处理后,其几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶均较对照显著增加,表明厚朴提取物可诱导桃果实内与抗病性相关的主要酶活性。Zhang et al.(2011)研究发现采用 β -氨基酸处理已接种青霉的苹果后,其几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶与对照组相比均显著升高,从而有效提高了采后苹果的抗病力。本试验中,芥菜乙醇提取物通过提高西瓜枯萎病菌细胞壁相关水解酶——几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶的活性,从而使细胞壁降解,抑制菌体生长,这与上述研究结果相似。

SDH和MDH是三羧酸循环中2个重要的氧化还原酶,是菌体进行能量代谢的关键枢纽。彭旋等(2017)报道了意大利青霉 *Penicillium italicum* 经白薇提取液处理后,其SDH和MDH活性均降低,菌体生长的能量代谢水平相应降低,从而影响菌体的正常生长。蒋斌等(2018)研究发现金黄色葡萄球菌经连翘溶液处理后,菌体中的SDH和MDH活性显著降低,能量代谢受阻,从而发挥抑菌作用。芥菜乙醇提取物处理西瓜枯萎病菌后,可使菌体还原糖和可溶性蛋白的含量降低,糖和蛋白质是菌体进行生理代谢的能量物质,能为菌体的生命活动提供能量;当菌体的细胞膜遭到损坏时,其自身细胞内的糖和蛋白质合成及利用会受到影响,含量也会随之发生变化。芥菜中的活性物质可以抑制菌体合成及吸收能源物质,使得菌体代谢减慢,抑制菌体的正常生长。黄聪亮等(2017)也发现金线莲乙醇提取物通过降低金黄色葡萄球菌对还原糖和蛋白质的利用率来抑制其生长繁殖。

综上所述,芥菜乙醇提取物对西瓜枯萎病菌有较明显的抑制作用。其作用机理主要有以下2个方面:一是降低了SDH和MDH的活性,使菌体能量代谢水平减慢;抑制菌体吸收细胞外的蛋白、葡萄糖等物质,同时自身合成蛋白、葡萄糖的能力减弱或受阻,从而影响和抑制了病菌的正常生长;二是使菌体

细胞膜脂过氧化程度加深,膜透性增大,蛋白质和还原糖外泄;菌体细胞壁几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶活性升高,细胞壁发生降解,菌体结构遭到破坏,使菌体自溶。本试验仅测定了芥菜乙醇提取物对西瓜枯萎病菌的离体生物活性,在今后的试验中还应结合西瓜的大田生产开展相关试验,以期将芥菜乙醇提取物开发成高效、环保、安全的植物源杀菌剂提供更充足的理论依据。

参 考 文 献 (References)

- Cao JK, Jiang WB, Zhao YM. 2007. Experiment guidance of postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables. Beijing: China Light Industry Press (in Chinese) [曹建康, 姜微波, 赵玉梅. 2007. 果蔬采后生理生化实验指导. 北京: 中国轻工业出版社]
- Chen CY, Peng X, Chen JY, Wan CP. 2019. Antifungal activity of *Cynanchum atratum* alkaloids against citrus postharvest blue mould. *Journal of Fruit Science*, 36(1): 94–102 (in Chinese) [陈楚英, 彭旋, 陈金印, 万春鹏. 2019. 白薇生物碱类成分抑制柑橘采后青霉菌活性. 果树学报, 36(1): 94–102]
- Chen CY, Peng X, Chen YH, Wan CP, Chen JY. 2016. Screening of antifungal activity of extracts from 21 species of medicinal plants against *Penicillium italicum* of citrus fruits and the efficacy of *Cynanchum atratum* ethanol extracts for control. *Journal of Plant Protection*, 43(4): 614–620 (in Chinese) [陈楚英, 彭旋, 陈玉环, 万春鹏, 陈金印. 2016. 21种药用植物提取物对柑橘青霉病抑菌作用的筛选及白薇醇提取物对脐橙青霉病的防治效果. 植物保护学报, 43(4): 614–620]
- Chen YQ. 2002. Biochemical experimental methods and techniques. Beijing: Science Press, pp. 97–100 (in Chinese) [陈毓荃. 2002. 生物化学实验方法和技术. 北京: 科学出版社, pp. 97–100]
- Cheng DM, Wang ZF, Zeng FK, Yu XP. 2011. Antimicrobial function of *Perilla frutescens* (L.) Britt alcohol extract. *Journal of Chengdu Medical College*, 6(3): 222–225 (in Chinese) [程道梅, 王中凤, 曾凡坤, 余小平. 2011. 紫苏乙醇提取物抑菌活性研究. 成都医学院学报, 6(3): 222–225]
- Dau VT, Dang NV, Nguyen DH, Pham LT, Le TTM, Phan HT, Burgess LW. 2009. A simplified technique for grafting watermelon onto resistant cucurbit rootstocks for control of *Fusarium* wilt of watermelon in Nghe An Province, Vietnam. *Australasian Plant Disease Notes*, 4(1): 114–116
- Gao JF. 2006. Plant physiology experiment guide. Beijing: Higher Education Press (in Chinese) [高俊凤. 2006. 植物生理学实验指导. 北京: 高等教育出版社]
- Huang CL, Zou L, Hu YY, Li ZM, Chen WX. 2017. Antibacterial activity of the ethanol extract of *Anoectochilus roxburghii* on *Staphylococcus aureus*. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 38(1): 150–154 (in Chinese) [黄聪亮, 邹兰, 胡月英, 黎智明, 陈文学. 2017. 金线莲乙醇提取物对金黄色葡萄球菌抑菌性能研究. 热带作物学报, 38(1): 150–154]
- Huang CY, Bu YQ, Shan ZJ, Dai CC. 2016. Research advances in mechanisms of watermelon continuous cropping diseases and its biological control. *Chinese Journal of Ecology*, 35(6): 1670–1676 (in Chinese) [黄春艳, 卜元卿, 单正军, 戴传超. 2016. 西瓜连作病害机理及生物防治研究进展. 生态学杂志, 35(6): 1670–1676]
- Huang RH, Liu JH, Lu YM, Xia RX. 2008. Effect of salicylic acid on the antioxidant system in the pulp of 'cara cara' navel orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) at different storage temperatures. *Postharvest Biology and Technology*, 47(2): 168–175
- Jakatimath SP, Mestral RK, Mushrif SK, Biradar IB, Ajappalavar PS. 2017. *In vitro* evaluation of fungicides, botanicals and bio-agents against *Phomopsis vexans*, the causal agent of fruit rot of brinjal. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 11(1): 229–235
- Jiang B, Su Y, Cai YH. 2018. Experimental study on inhibitory effects and its mechanism of forsythia on *Staphylococcus aureus*. *Genomics and Applied Biology*, 37(8): 3401–3406 (in Chinese) [蒋斌, 苏琰, 蔡玉华. 2018. 连翘对金黄色葡萄球菌的抑菌作用及机制的试验研究. 基因组学与应用生物学, 37(8): 3401–3406]
- Li SH, Dong HL, Jin R, Mo HB, Liu SQ, Li SC, Cao H. 2015. Inhibition mechanism of antifungal compounds from *Asarum himalaicum* against *Alternaria solani*. *Journal of Inner Mongolia Agricultural University (Natural Science Edition)*, 36(3): 17–21 (in Chinese) [李少华, 董海龙, 靳然, 莫海波, 刘素琪, 李生才, 曹挥. 2015. 细辛活性物质对番茄早疫病作用机理的研究. 内蒙古农业大学学报(自然科学版), 36(3): 17–21]
- Li SS, Liu L, Li M, Wan CP, Fan SY. 2018. Antifungal activity of chlorogenic acid from *Chrysanthemum coronarium* L. on *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 32(1): 104–111 (in Chinese) [李珊珊, 刘琳, 李猛, 万春鹏, 范淑英. 2018. 茼蒿中绿原酸抑制西瓜枯萎病菌活性研究. 核农学报, 32(1): 104–111]
- Li XF, Xu Z. 2018. Research progress on botanical fungicides. *South China Agriculture*, 12(13): 40–42, 45 (in Chinese) [李晓菲, 徐政. 2018. 植物源杀菌剂研究进展. 南方农业, 12(13): 40–42, 45]
- Liao SL, Yin W, Liao XL, Zhang Y. 2017. Inhibition of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by ethyl acetate extract of *Amaranthus tricolor* L. and its mechanism. *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences)*, 43(5): 544–550 (in Chinese) [廖石榴, 尹维, 廖晓兰, 张亚. 2017. 苋菜乙酸乙酯提取物对柑橘溃疡病菌的抑制及机理研究. 湖南农业大学学报(自然科学版), 43(5): 544–550]
- Liu FJ. 2018. Effects and mechanisms of ethanol extracts from different parts of *Perilla frutescens* on apple tree canker. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 46(17): 97–101 (in Chinese) [刘芳洁. 2018. 紫苏不同部位乙醇提取物对苹果树腐烂病的影响及机制. 江苏农业科学, 46(17): 97–101]
- Liu Q, Zhang XL, Fan SY. 2016. Preliminary research on antifungal effect of extracts from garland chrysanthemum on watermelon blight. *Northern Horticulture*, (14): 114–118 (in Chinese) [刘琼, 张新龙, 范淑英. 2016. 茼蒿提取物对西瓜枯萎病菌抑制效

- 果的初步研究. 北方园艺, (14): 114–118]
- Mauch F, Hadwiger LA, Boner T. 1984. Ethylene: symptom, not signal for the induction of chitinase and β -1,3-glucanase in pea pods by pathogens and elicitors. *Plant Physiology*, 76(3): 607–611
- Miguel A, Maroto JV, San Bautista A, Baixauli C, Cebolla V, Pascual B, Lopez S, Guardiola JL. 2004. The grafting of triploid watermelon is an advantageous alternative to soil fumigation by methyl bromide for control of *Fusarium* wilt. *Scientia Horticulturae*, 103(1): 9–17
- Nagpure A, Choudhary B, Kumar S, Gupta RK. 2014. Isolation and characterization of chitinolytic *Streptomyces* sp. MT7 and its antagonism towards wood-rotting fungi. *Annals of Microbiology*, 64(2): 531–541
- Peng X, Chen YH, Chen JY. 2017. Antifungal mechanism of *Cynanchum atratum* Bunge extracts on *Penicillium italicum* and control effect on blue mold of navel orange. *Acta Phytopathologica Sinica*, 47(3): 398–405 (in Chinese) [彭旋, 陈玉环, 陈金印. 2017. 白薇提取液对意大利青霉抑菌机理及脐橙青霉病防治效果的研究. 植物病理学报, 47(3): 398–405]
- Prochazkova D, Sairam RK, Srivastava GC, Singh DV. 2001. Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves. *Plant Science*, 161(4): 765–771
- Wan CP, Liu Q, Zhang XL, Fan SY. 2014. A review of the chemical composition and biological activities of the edible and medicinal plant *Chrysanthemum coronarium* L. *Modern Food Science and Technology*, 30(10): 282–288 (in Chinese) [万春鹏, 刘琼, 张新龙, 范淑英. 2014. 药食两用植物茼蒿化学成分及生物活性研究进展. 现代食品科技, 30(10): 282–288]
- Wang YX, Ji LZ, Liu Y, Zhang Y, Yi XM. 2015. Mechanism of extracts obtained from *Polygonum cuspidatum* to suppress *Valsa mali*. *Chinese Journal of Biological Control*, 31(1): 148–156 (in Chinese) [王远遐, 姬兰柱, 刘艳, 张悦, 易雪梅. 2015. 虎杖提取物对苹果腐烂病菌的抑菌机制. 中国生物防治学报, 31(1): 148–156]
- Xu HX, Zheng XS, Tian JC, Lai FX, He JC, Lü ZX. 2017. Advances in the development and application of control technologies for insect pest management in paddy fields in China. *Journal of Plant Protection*, 44(6): 925–939 (in Chinese) [徐红星, 郑许松, 田俊策, 赖凤香, 何佳春, 吕仲贤. 2017. 我国水稻害虫绿色防控技术的研究进展与应用现状. 植物保护学报, 44(6): 925–939]
- Xu ZJ, Wang XY, Chen J, Shi QD. 2016. The inhibitory mechanism of the alcoholic extract from walnut peel against mould. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 38(2): 290–296 (in Chinese) [许紫峻, 汪溪远, 陈娇, 师庆东. 2016. 核桃青皮乙醇提取物抑制霉菌作用机理初步探索. 江西农业大学学报, 38(2): 290–296]
- Yan Y, Li YM, Zhang YL, Wang X, Jian LP. 2018. Optimization of extraction technology of flavonoids from sweet potato leaves and antimicrobial and antioxidant activity. *Guangxi Forestry Science*, 47(3): 311–315 (in Chinese) [延永, 李玉萌, 张亦琳, 王溪, 简丽萍. 2018. 红薯叶总黄酮的提取工艺优化及其抑菌、抗氧化活性研究. 广西林业科学, 47(3): 311–315]
- Yang CF, Zuo WM, Sun HQ, Li JP, Liu LK. 2018. Research advancement of onion's chemical ingredient and pharmaceutical action. *Qinghai Prataculture*, 27(3): 55–59 (in Chinese) [杨春芳, 左文明, 孙汉青, 李锦萍, 刘力宽. 2018. 洋葱的化学成分及药理作用研究综述. 青海草业, 27(3): 55–59]
- Zhang CF, Wang JM, Zhang JG, Hou CJ, Wang GL. 2011. Effects of β -aminobutyric acid on control of postharvest blue mould of apple fruit and its possible mechanisms of action. *Postharvest Biology and Technology*, 61(2/3): 145–151
- Zhang L, Feng XY, Wang ZJ, Li WS, Wang BG, Yang JJ. 2010. Effect of cortex *Magnolia officinalis* extract treatment on disease resistance of harvested peach fruit. *Science and Technology of Food Industry*, 31(10): 136–138 (in Chinese) [张莉, 冯晓元, 王政军, 李文生, 王宝刚, 杨军军. 2010. 采后厚朴提取物处理对桃果实抗病性的影响. 食品工业科技, 31(10): 136–138]
- Zhao G, Zhang WN, Zuo CW, Huang YH. 2017. Control effect of Chinese leek extract and its main bioactive components on apple ring rot incidence. *Chinese Journal of Biological Control*, 33(2): 273–280 (in Chinese) [赵刚, 张卫娜, 左存武, 黄永红. 2017. 韭菜提取物及其主要活性物质防控苹果轮纹病发生的研究. 中国生物防治学报, 33(2): 273–280]
- Zhou JC, Liu JA, He YH, Zhou GY. 2015. Inhibitory effects of the extracts of 13 invasive plants from Hainan against *Colletotrichum gloeosporioides* on *Dalbergia odorifera*. *Plant Protection*, 41(5): 54–60 (in Chinese) [周洁尘, 刘君昂, 何苑皞, 周国英. 2015. 13种海南入侵植物提取物对降香黄檀炭疽病菌的抑制作用. 植物保护, 41(5): 54–60]
- Zhou JW, Zhou HL, Yi YJ, Bo LY, Li GY. 2016. The antifungal activity and mechanism of *Brevibacillus brevis* on plant pathogenic fungus. *Journal of Plant Protection*, 43(4): 600–607 (in Chinese) [周金伟, 周红丽, 易有金, 柏连阳, 李高阳. 2016. 短短芽胞杆菌对植物病原真菌的抑菌活性和抑菌机理. 植物保护学报, 43(4): 600–607]

(责任编辑:李美娟)