



张叶,张国良,黄志炜,等.夹竹桃鲜叶黄酮对水稻纹枯病菌抑菌效应[J].黑龙江农业科学,2023(8):44-49,50.

夹竹桃鲜叶黄酮对水稻纹枯病菌抑菌效应

张 叶,张国良,黄志炜,邓江霞,李边豪

(淮阴工学院 生命科学与食品工程学院,江苏 淮安 223003)

摘要:为研究夹竹桃鲜叶黄酮对水稻纹枯病菌的抑菌活性及对水稻纹枯病细胞壁与细胞膜作用机制,用不同浓度的夹竹桃鲜叶黄酮处理水稻纹枯病菌,研究其对水稻纹枯病菌菌丝体的影响。结果表明,夹竹桃鲜叶黄酮对水稻纹枯病菌的最小抑菌浓度为 $4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。扫描电镜结果发现,未经处理菌丝粗细均匀,菌丝表面光滑饱满,伸展良好;夹竹桃鲜叶黄酮处理后菌丝严重受损,褶皱明显,内凹孔加深,细胞破裂等现象,夹竹桃鲜叶黄酮可显著诱导几丁质酶和 β -1,3 葡聚糖酶的活性。夹竹桃鲜叶黄酮对水稻纹枯病菌细胞膜通透性有显著影响,细胞内容物大量外泄,提高致病菌细胞膜渗透性,抑制膜的结构物质麦角固醇的合成,且作用时间越长破坏性越强。综上所述,影响其正常生理功能,为有效防止水稻纹枯病提供新思路。

关键词:夹竹桃鲜叶黄酮;水稻纹枯病;最小抑菌浓度;抑菌机制

由立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)引起的纹枯病是水稻三大病害之一,近年来随着多穗矮秆品种的种植、偏施氮肥等导致其危害呈现加重趋势^[1]。生产上对水稻纹枯病的防治方法主要有选育抗病品种(水稻对纹枯病的抗性受微效多基因的控制,目前还未发现免疫和高抗品种)、农药防治(井冈霉素等)、农业防治(栽培管理)、生物防治(生防菌及其次生代谢产物)等^[2-6]。由于连续多年用药,病原菌产生明显的抗药性^[7],化学农药的大量使用对环境造成了严重的污染,因而开发安全、环境友好型的植物源农药成为目前生产上急需解决的问题。

植物源农药是一类从植物中提取抑菌作用的成分,将其直接或间接加工、合成的新型农药,具有低毒、低残留、对非靶标生物及环境安全的特点^[8]。有研究表明植物源农药抑制真菌病害效果更佳^[9],主要是因为其中的活性成分,比如黄酮类、多酚类、生物碱类等化合物,都具有较强的抑菌活性。夹竹桃(*Nerium oleander* L.)又称柳叶桃,属被子植物门,双子叶植物纲,夹竹桃科,南北方均有种植。夹竹桃叶片含有丰富的黄酮^[10],具有抑菌作用^[11-12]。大量研究表明黄酮类化合物通过影响细胞膜功能发挥抑菌机制^[13-15],植物源

黄酮被证明具有良好的透膜能力,可以破坏真菌细胞结构的完整性和细胞膜通透性,从而导致细胞内有机物的渗漏。然而,关于植物源黄酮对水稻纹枯病菌抑菌效应及抑菌机理的研究还未见报道。

因此,本研究测定夹竹桃鲜叶黄酮对水稻纹枯病菌最小抑菌浓度,利用扫描电子显微镜观察夹竹桃鲜叶黄酮对水稻纹枯病菌菌丝表面形态变化的影响,此外,还研究了夹竹桃鲜叶黄酮对水稻纹枯病菌细胞壁、细胞膜的影响,旨在探索夹竹桃鲜叶黄酮对水稻纹枯病菌抑制效果及其抑菌机理,以期开发新型的天然、绿色、高效的抗菌剂。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料与试剂 试验于2022年5月至10月进行,在淮阴工学院南苑采集夹竹桃叶片,经淮阴工学院作物生理生态与生物技术实验室鉴定为夹竹桃属夹竹桃。取花期白花型夹竹桃的鲜叶,用自来水冲洗表面的泥土和灰尘,在无菌操作台中用75%乙醇表面消毒,晾干后备用;立枯丝核菌 RH-9 (属于 AG1-IA 菌丝融合群)为淮阴工学院作物生理生态与生物技术实验室保藏,取菌株活化后备用。

溴化钾(光谱纯,国药集团);2.5%戊二醛(分析纯,上海麦克林生化科技有限公司);磷酸缓冲液($0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH7.4,上海源叶生物科技有限公司);醋酸异戊酯(上海麦克林生化科技有限公司);三氯乙酸(分析纯,上海麦克林生化科技有限公司); β -1,3 葡聚糖酶试剂盒和几丁质酶试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)。

1.1.2 仪器与设备 LGJ-50G 型真空冷冻干燥机;Nicolet5700 型傅里叶变换红外光谱仪;S-3000N型扫描电子显微镜;紫外可见分光光度

收稿日期:2023-04-15

基金项目:全国农业重大技术协同推广计划项目(2021-ZYXT-02-1);江苏现代农业重点计划项目(BE2021323);江苏省自然科学基金面上项目(BK2012667, BK2008193);江苏省第六期“333 工程”重点行业领域人才项目。

第一作者:张叶(1995—),女,硕士研究生,从事植物抗病活性物质提取研究。E-mail:1537684604@126.com。

通信作者:张国良(1976—),男,博士,教授,从事植物抗病活性物质提取及其功能研究。E-mail:hgzgl@126.com。

计;ZD-85AS 型冷冻气浴恒振荡器;DDS-307A 型电导率仪。

1.2 方法

1.2.1 夹竹桃鲜叶中黄酮的提取与纯化 将夹竹桃鲜叶洗净、烘干、粉碎并过 80 目筛,按照料液比 1:6 加 55% 浓度的乙醇,于 40 °C 旋转蒸发得到的浓缩液冷冻干燥即得夹竹桃鲜叶粗提冻干粉。将其用 20% 甲醇溶解配制成 $25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,真空抽滤后过聚酰胺柱,分别用水、20% 甲醇、30% 甲醇、40% 甲醇、75% 甲醇、100% 甲醇洗脱,每一段洗脱液用紫外光检查颜色,直到看不到荧光色点。最后将洗脱液收集后旋蒸、冷冻干燥,得到纯化后的夹竹桃鲜叶黄酮粉末。

1.2.2 夹竹桃鲜叶黄酮对立枯丝核菌最小抑菌浓度(MIC)的测定 采用琼脂稀释法^[16]测定夹竹桃鲜叶黄酮对立枯丝核菌的 MIC。选取抑菌效果最好的夹竹桃鲜叶总黄酮母液进行梯度稀释,取 5 mL 趁热加入 50 mL 的 PDA 培养基中混匀倒平板,使得抑菌液的最终浓度分别为 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 和 $8.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。加入等体积的乙醇和无菌水分别作为对照和空白对照。取直径 6 mm 的立枯丝核菌菌块,接种到不同浓度的平板上,于 28 °C 培养观察 48 h,以没有菌生长的最小浓度作为抑菌液的 MIC。

1.2.3 夹竹桃鲜叶黄酮对立枯丝核菌细胞壁完整性的影响 对立枯丝核菌的形态观察:将立枯丝核菌分别在 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 夹竹桃鲜叶黄酮提取液培养基上培养 3 d,在菌丝边缘取 0.5 cm 的菌块,放到装有 1 mL 2.5% 戊二醛固定液的离心管中,用注射器抽真空直至菌丝表面气泡消失,于 4 °C 放置 4 h。吸去固定液,用磷酸缓冲液漂洗 3 次,每次 10 min。依次用浓度为 30%、50%、70%、80% 和 90% 的乙醇溶液进行脱水,再用 100% 乙醇脱水处理,每次时间为 10 min。最后样品用醋酸异戊酯过渡,于真空冷冻干燥机干燥,用扫描电镜观察拍照。

对立枯丝核菌细胞壁中 β -1,3 葡聚糖酶活性的影响:将培养 3 d 的供试立枯丝核菌打取直径为 6 mm 的菌块接种于 PDB 培养液中,28 °C $170 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养 3 d,处理组加入夹竹桃鲜叶黄酮溶液 1 mL,对照组加入 50% 乙醇 1 mL,分别于 0, 3, 6, 9, 12 和 15 h 后过滤收集不同处理组菌丝和对照组菌丝。加入提取液,充分研磨,4 °C 离心 10 min。精密称取 0.029 mg 乙二胺四乙酸,0.1 g 抗坏血酸,吸取 35 μL 2-巯基乙醇,用乙酸-乙酸钠缓冲液溶解并定容至 100 mL。取 0.1 g 菌丝,加入 1 mL 提取缓冲液,冰浴研磨成匀浆,10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min。取粗酶液 100 μL ,加入 100 μL 昆布多糖

溶液,于 37 °C 反应 1 h 后,加入 1.8 mL 蒸馏水和 1.5 mL DNS 试剂,沸水浴 5 min 后迅速冷却,用蒸馏水定容至 10 mL,测定 540 nm 处吸光度值。以每秒钟酶分解昆布多糖产生 $1 \times 10^{-9} \text{ mol}$ 葡萄糖为一个 β -1,3 葡聚糖酶活性单位。

对立枯丝核菌细胞壁中几丁质酶活性的影响:菌丝处理同上,精密称取 0.029 mg 乙二胺四乙酸,吸取 35 μL 2-巯基乙醇,用乙酸-乙酸钠缓冲液溶解并定容至 100 mL 即得几丁质酶提取液。称取约 0.1 g 菌丝,加入 1 mL 提取液,冰浴研磨成匀浆,10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min,取上清液。再取 0.5 mL 酶液,加入 0.5 mL 几丁质悬浮液,37 °C 水浴 1 h,10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取 0.5 mL 离心上清液,加入 0.1 mL 0.6 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 四硼酸钾,煮沸 5 min,迅速冷却后,加入 2 mL 用冰醋酸稀释 5 倍的二甲基乙酰胺,37 °C 反应 20 min,于 585 nm 处测定吸光度值。其中对照组为煮沸的酶液,以每秒钟酶分解几丁质产生 $1 \times 10^{-9} \text{ mol}$ 乙酰葡萄糖胺为一个几丁质酶活性单位。

1.2.4 夹竹桃鲜叶黄酮对立枯丝核菌细胞膜完整性的影响 对立枯丝核菌细胞渗透性的影响:菌丝处理同上,过滤收集菌体,蒸馏水冲洗 3 次得立枯丝核菌菌丝体,用蒸馏水清洗 2 次,加入 20 mL 蒸馏水。然后处理组加入浓度为 1/2MIC 的夹竹桃鲜叶黄酮提取液,对照组加入等量的 50% 乙醇。在转速为 160 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,28 °C 恒温培养摇床回旋震荡培养 0,3,6,9,12 和 15 h。离心取上清液用电导率仪测定细胞外电导率($\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$)。

对立枯丝核菌细胞内蛋白质含量的影响:称取培养至 0,3,6,9,12 和 15 h 的对照组和处理组菌丝 100 mg,用 10 mL 水溶解,将菌丝置于 4 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后,取菌丝上清液测其可溶性蛋白含量,用牛血清蛋白标品制作标准曲线,求可溶性蛋白质含量(%)。

对立枯丝核菌细胞内还原糖含量的影响:称取培养至 0,3,6,9,12 和 15 h 的空白组和处理组菌丝 100 mg,用 10 mL 去离子水溶解,将菌丝悬浮液置于 4 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后,取菌丝上清液用苯酚硫酸法测其还原糖含量,用葡萄糖标品制作标准曲线,求还原糖含量(%)。

对立枯丝核菌细胞内核酸含量的影响:OD₂₆₀ 代表核酸的紫外吸收峰,260 nm 处的吸光值与胞外核酸含量呈正相关,因此通过检测 260 nm 处的吸光度,可以估计细胞释放的核酸量,间接表征细胞膜的完整性。称取培养至 0,3,6,9,12 和 15 h 的对照组和处理组菌丝 100 mg,用 PBS 清洗

菌丝,4 000 r·min⁻¹离心 10 min 后收集上清液,用紫外可见分光光度计测定 260 nm 处吸光度值,计算核酸含量(%)。

对立枯丝核菌细胞内麦角固醇含量的影响:称取培养至 0,3,6,9,12 和 15 h 的空白组和处理组菌丝 100 mg,加入 25%乙醇硝酸钾溶液 5 mL,剧烈震荡 2 min,85 ℃条件水浴 4 h;加入 2 mL 无菌水和 5 mL 正庚烷萃取,涡旋 2 min,室温下静置 1 h,收集上层正庚烷层,用紫外分光光度计测 230

和 282 nm 处吸光值,计算麦角固醇含量(%)。

2 结果与分析

2.1 夹竹桃鲜叶黄酮对立枯丝核菌的最小抑菌浓度确定

由表 1 可知,培养 48 h 时,4.0 g·L⁻¹夹竹桃鲜叶黄酮处理的平板中立枯丝核菌菌落无生长,表明夹竹桃鲜叶黄酮抑制立枯丝核菌的最小抑菌浓度(MIC)为 4.0 g·L⁻¹,继续培养至 72 h 时,开始有菌丝生长。

表 1 不同浓度夹竹桃鲜叶黄酮对立枯丝核菌菌落直径的影响

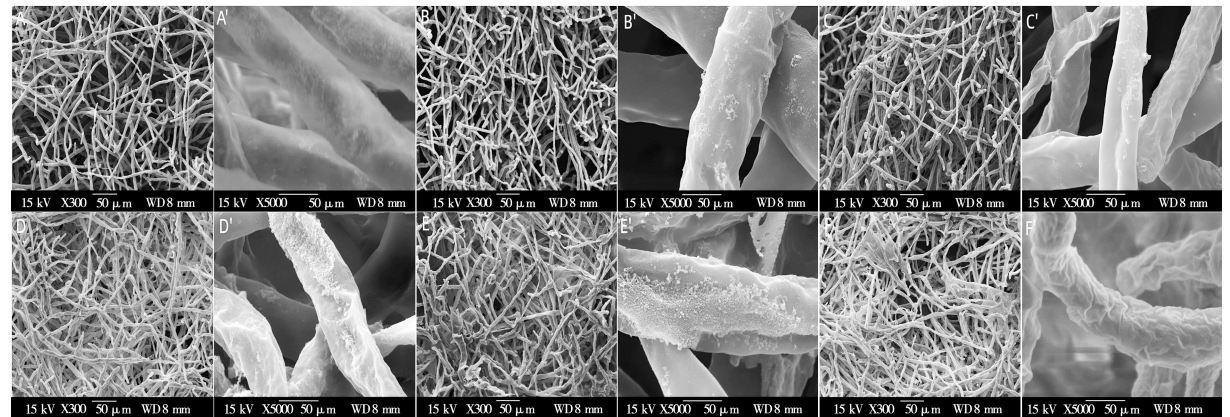
抑菌液浓度/(g·L ⁻¹)	菌落直径/cm			
	24 h	48 h	72 h	96 h
0(空白对照)	4.87±0.04 a	5.66±0.13 a	6.85±0.07 a	7.49±0.16 a
0(乙醇对照)	4.73±0.21 a	5.54±0.07 a	6.89±0.12 a	7.24±0.05 a
0.5	3.06±0.52 b	4.14±0.08 b	4.98±0.36 b	6.02±0.18 b
1.0	0.64±0.03 c	3.93±0.06 c	4.59±0.2 bc	5.44±0.34 c
2.0	0.41±0.01 c	3.78±0.26 c	4.33±0.04 c	5.18±0.08 d
4.0	0 d	0 d	0.55±0.02 d	2.69±0.04 e
8.0	0 d	0 d	0 e	0 f

注:不同小写字母表示在 P<0.05 水平差异显著。下同。

2.2 夹竹桃鲜叶黄酮处理后立枯丝核菌的形态观察

由图 1 可知,经夹竹桃鲜叶黄酮处理后的立枯丝核菌菌丝形态发生了明显的变化。对照的菌丝粗细均匀,菌丝表面光滑且伸展良好(图 1A);经夹竹桃鲜叶黄酮处理 3 h 后菌丝出现轻微褶皱现象(图 1B);经夹竹桃鲜叶黄酮处理 6 h 后处理

后菌丝明显异常,表现为菌丝皱缩变形及表面发生大量褶皱现象(图 1C);经夹竹桃鲜叶黄酮处理 9 h 后菌丝异常变形严重,褶皱明显并出现内凹孔等现象(图 1D);经夹竹桃鲜叶黄酮处理 15 h 处理后菌丝严重受损,褶皱明显,内凹孔加深,细胞破裂(图 1F)。



A. 对照(正常生长),300 倍镜; A'. 对照(正常生长),5 000 倍镜; B. 处理 3 h,300 倍镜; B'. 处理 3 h,5 000 倍镜; C. 处理 6 h,300 倍镜; C'. 处理 6 h,5 000 倍镜; D. 处理 9 h,300 倍镜; D'. 处理 9 h,5 000 倍镜; E. 处理 12 h,300 倍镜; E'. 处理 12 h,5 000 倍镜; F. 处理 15 h,300 倍镜; F'. 处理 15 h,5 000 倍镜。

图 1 夹竹桃鲜叶黄酮处理后立枯丝核菌的扫描电镜图

2.3 夹竹桃鲜叶黄酮处理对立枯丝核菌细胞壁中 β-1,3-葡聚糖酶活性的影响

由图 2 可知,随着夹竹桃鲜叶黄酮处理时间的延长,处理组 β-1,3-葡聚糖酶活性呈显著增加的趋势。当夹竹桃鲜叶黄酮处理时间为 0 h 时,

立枯丝核菌菌丝无法生长,β-1,3-葡聚糖酶活性较低;当处理时间为 15 h 时,β-1,3-葡聚糖酶活性达到最大值,为 3.304 1 U·g⁻¹,是对照组的 1.25 倍,显著高于对照组。由此可见,夹竹桃鲜叶黄酮能够诱导立枯丝核菌 β-1,3-葡聚糖酶活性。

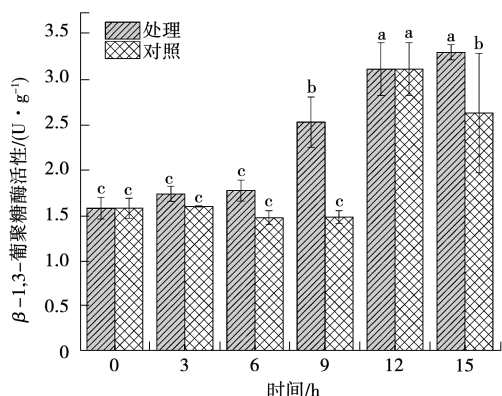


图2 夹竹桃鲜叶黄酮不同处理时间对立枯丝核菌胞内 β -1,3-葡聚糖酶活性的影响

注:不同小写字母表示在 $P<0.05$ 水平差异显著。下同。

2.4 夹竹桃鲜叶黄酮对立枯丝核菌细胞壁中几丁质酶活性的影响

由图3可知,随着夹竹桃鲜叶黄酮处理时间的延长,立枯丝核菌细胞壁中几丁质酶活性呈先显著降低再增加后降低的趋势,在处理时间为9 h时,几丁质酶活性达到最低值,为 $3.61\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$,是对照组的1.05倍,二者差异不显著。随后处理组几丁质酶活性显著增加,当处理时间为12 h时,与对照组相比,几丁质酶活性增加了 $3.36\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$,显著高于对照。夹竹桃鲜叶黄酮处理的立枯丝核菌中的几丁质酶的活性被显著诱导,夹竹桃鲜叶黄酮可透过立枯丝核菌的细胞壁,抑制细胞壁中几丁质的合成,使立枯丝核菌细胞壁受损。

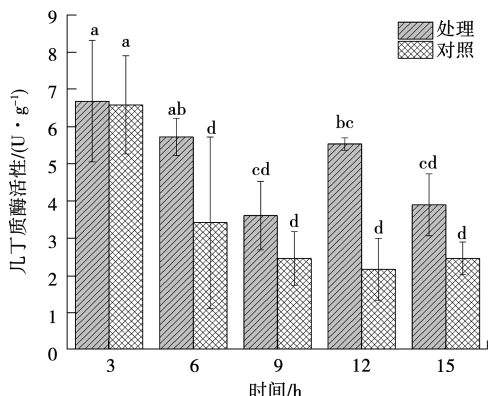


图3 夹竹桃鲜叶黄酮不同处理时间对立枯丝核菌胞内几丁质酶活性的影响

2.5 夹竹桃鲜叶黄酮对立枯丝核菌细胞膜通透性的影响

由图4可知,细胞膜是一种选择透过性膜,具有一定的渗透性,细胞内存在大量内容物,完整的细胞膜渗透性较低,当受到抑菌活性物质干扰,立枯丝核菌细胞膜被破坏,细胞外液的电导率增大。未受夹竹桃鲜叶黄酮处理的细胞膜完整,膜的渗透性均较低。当处理时间为0 h时,经夹竹桃鲜叶黄

酮处理立枯丝核菌后电导率与对照组差异不显著,当处理时间为3 h时,经夹竹桃鲜叶黄酮处理立枯丝核菌后电导率是对照组的1.13倍,显著高于对照。随着处理时间的延长,电导率增大,且作用时间越长,电导率值越大,细胞膜完整性破坏越严重。

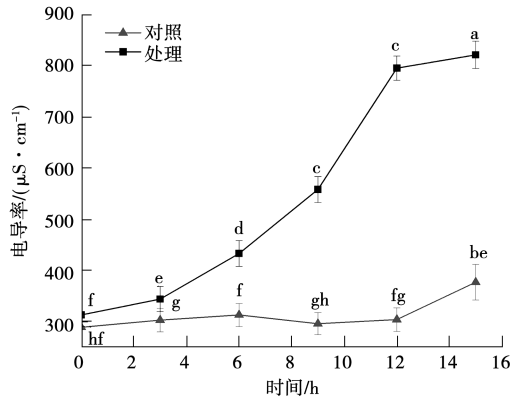


图4 夹竹桃鲜叶黄酮不同处理时间对立枯丝核菌细胞渗透性的影响

2.6 夹竹桃鲜叶黄酮对立枯丝核菌细胞内蛋白质含量的影响

由图5可知,夹竹桃鲜叶黄酮未处理立枯丝核菌细胞时,细胞内少量蛋白质会渗出细胞进行正常的物质交换及细胞代谢,且可溶性蛋白质含量较稳定,整个测量期间对照组均较平缓。其中当夹竹桃鲜叶黄酮处理立枯丝核菌3 h后,立枯丝核菌胞内蛋白透过细胞膜释放至细胞外,处理组蛋白质含量比对照组高0.17,差异显著。夹竹桃鲜叶黄酮作用时间越长,膜破坏越严重,当处理时间为15 h后,处理组蛋白质含量比对照组高0.409,胞外蛋白质含量显著增高。

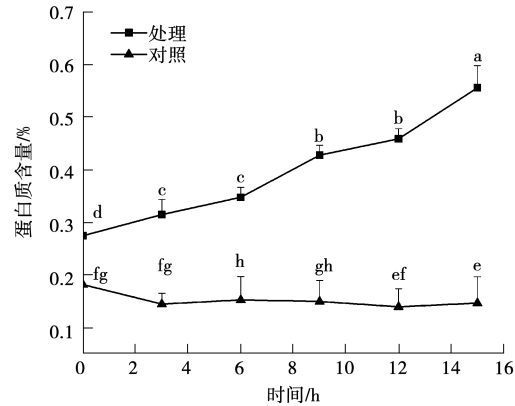


图5 夹竹桃鲜叶黄酮不同处理时间对立枯丝核菌胞内蛋白质含量的影响

2.7 夹竹桃鲜叶对立枯丝核菌细胞内还原糖含量的影响

还原糖为立枯丝核菌细胞内可溶性物质,被细胞膜包裹。由图6可知,夹竹桃鲜叶黄酮处理

立枯丝核菌后,当处理 0 h 时,对照组还原糖含量比处理组含量高 0.50 百分点,差异不显著。当处理 6 h 时,处理组立枯丝核菌病菌体内还原糖含量比对照组低 0.89 百分点,差异显著。处理 15 h 时,处理组立枯丝核菌病菌体内还原糖含量比对照组低 5.19 百分点,差异显著。随着作用时间的延长,细胞膜渗透性增大,细胞内容物大量溶出,还原糖含量降低。

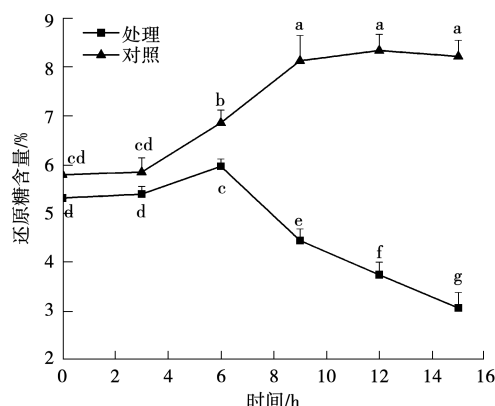


图 6 夹竹桃鲜叶黄酮不同处理时间对立枯丝核菌细胞内还原糖含量的影响

2.8 夹竹桃鲜叶对立枯丝核菌细胞内麦角固醇含量的影响

由图 7 可知,立枯丝核菌经夹竹桃鲜叶黄酮处理后,与对照相比,细胞膜中麦角固醇含量均减少且夹竹桃鲜叶黄酮处理时间越长,细胞膜中的麦角固醇含量越少。未经处理的水稻纹枯病菌,麦角固醇含量为 0.038 54%,随着夹竹桃鲜叶黄酮处理时间的延长,麦角固醇含量依次减少,分别比对照组减少了 0.019 百分点、0.016 百分点、0.022 百分点和 0.024 百分点,其差异均显著。结果表明,夹竹桃鲜叶黄酮作用靶点为水稻纹枯病菌细胞膜,通过破坏膜中麦角固醇实现良好的抑菌性。

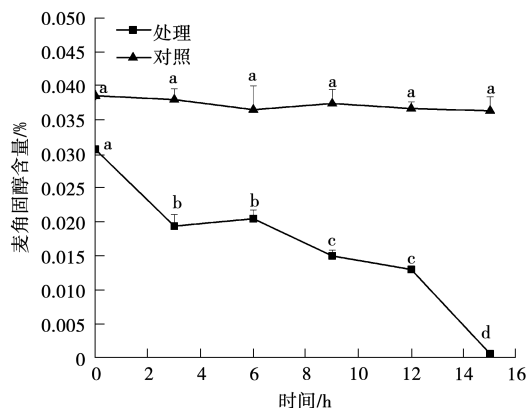


图 7 夹竹桃鲜叶黄酮不同处理时间对立枯丝核菌细胞内麦角固醇含量的影响

3 讨论

夹竹桃鲜叶黄酮对水稻纹枯病菌有明显的抑制效果,但是抑菌机制尚不清楚。目前已经鉴定出许多不同的天然抑菌剂的靶标,包括:细胞壁、细胞膜、线粒体和遗传物质等^[17]。几丁质、葡聚糖、甘露聚糖是真菌细胞壁的重要组成部分,在维持真菌细胞完整性、细胞形态和正常的生命活动中起重要作用。几丁质或 β -葡聚糖含量或其合成过程受阻都可能导致真菌细胞壁变形或细胞壁完整性失效^[18]。夹竹桃鲜叶黄酮对立枯丝核菌细胞破坏性强,结构破坏明显。经电镜观察发现,夹竹桃鲜叶黄酮可破坏立枯丝核菌的形态结构,出现扭曲、畸形、肿大、破裂等现象,使细胞壁出现不同程度的损伤。该结果与 He 等^[19]研究一致,通过扫描电镜观察可知,外源物质可作用于真菌细胞,破坏其细胞壁。几丁质是构成真菌细胞壁中的主要支架,排列有序,而 β -1,3-葡聚糖是细胞壁中的填充材料,并以无定形方式排列。夹竹桃鲜叶黄酮可激活几丁质酶的活性,几丁质被水解,细胞壁中几丁质的含量减少,水稻纹枯病菌细胞壁被破坏。方静等^[20]研究表明肉桂精油复合壳聚糖乳液提高了抗芒果炭疽病几丁质酶的活性。

黄酮类化合物是酚类衍生物,而酚类物质可破坏真菌细胞壁及细胞膜,使细胞内容物扩散、细胞膜通透性改变、细胞内外物质与信息的传递失衡而起到抑制真菌生长的作用。本研究发现夹竹桃鲜叶黄酮处理后能破坏水稻纹枯病菌细胞膜通透性。电导率是衡量细胞膜通透性的指标,电导率越高,表明电解质的渗漏越多,细胞受损越严重,细胞内含物中更多的小分子被释放出来,从而导致更高的电导率加速细胞死亡。且随着夹竹桃鲜叶黄酮处理时间延长,相对电导率增加,在处理 15 h 时,电导率最高,电解质渗漏多,说明夹竹桃鲜叶黄酮造成水稻纹枯病菌细胞膜的跨膜电势紊乱,导致离子外流,严重时导致衰亡。试验结果与 Zhou 等^[21]一致,活性物质作用于真菌细胞膜,使细胞膜完整性被破坏,胞内大量内容物外泄,电导率急剧增大。麦角固醇是真菌细胞膜的重要组成部分,对确保细胞活力、膜的流动性起着重要的作用。麦角固醇的减少会使真菌细胞膜受到损坏,导致细胞膜功能异常,进而造成细胞内容物泄漏,甚至导致细胞破裂死亡,因此麦角固醇含量的变化是衡量细胞膜受损的指标。夹竹桃鲜叶黄酮对水稻纹枯病菌细胞膜完整性均造成一定的破坏,且对膜中主要组成物质麦角固醇的合成造成不可

逆的抑制,细胞膜被破坏,大量内容物(蛋白质、还原性糖)外泄,最终使得细胞衰亡。该试验结果与陈雨晴等^[22]研究一致,经石菖醇提物处理后可增大菌体细胞膜通透性,导致菌体内核酸、蛋白质的大量泄露。

4 结论

夹竹桃鲜叶黄酮处理后菌丝严重受损,褶皱明显,内凹孔加深,细胞破裂等现象,夹竹桃鲜叶黄酮可显著诱导几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶的活性。夹竹桃鲜叶黄酮对水稻纹枯病菌细胞膜通透性有显著影响,细胞内容物大量外泄,提高致病菌细胞膜渗透性,抑制膜的结构物质麦角固醇的合成,且作用时间越长破坏性越强。夹竹桃鲜叶黄酮能抑制细胞膜的结构物质麦角固醇的合成;提高致病菌细胞膜的渗透性,使细胞内容物大量外泄,细胞无法正常代谢,且作用时间越长破坏性越强。

参考文献:

- [1] BALKEL D K, SHARME N R, SHAHJAHAN A K, et al. Antagonistic soil bacteria for biological control of rice sheath blight[J]. International Rice Research New Sletter, 1992, 17: 22-23.
- [2] BABY U I, MANIBHUSHAMAO K. Control of rice sheath might through the integration of fungal antagonists and organist amendmerits[J]. Tropical Agriculture, 1993, 70: 240-244.
- [3] 张国良,戴其根,张洪程,等. 硅肥和接种纹枯病菌对水稻膜脂过氧化和防御酶活性的影响[J]. 扬州大学学报, 2006, 27(1): 49-53.
- [4] ETESAMI H, MAHESHWARI D K. Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: action mechanisms and future prospects[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2018, 156: 225-246.
- [5] 魏丽梅,邹小文,徐婷璐,等. 农抗 211 对水稻纹枯病菌细胞膜和抗氧化酶活性的影响[J]. 核农学报, 2021, 35(5): 1084-1090.
- [6] MOLLA K A, KARMAKAR S, CHANDA P K, et al. Tissue-specific expression of *Arabidopsis* NPR1 gene in rice for sheath blight resistance without compromising phenotypic cost[J]. Plant Science, 2016, 250: 105-114.
- [7] HAKEEM K R, AKHTAR M S, ABDULLAH S N A. Effects of pesticides on environment[J]. Springer International Publishing, 2016, 10: 253-269.
- [8] MIRESMALLI S, ISMAN M B. Botanical insecticides inspired by plant herbivore chemical interactions[J]. Trends in Plant Science, 2014, 19(1): 29-35.
- [9] 包华,李康,钟睦琪,等. 胡椒碱对番茄灰霉病菌抑制作用及其机理研究[J]. 中国农业大学学报, 2022, 27(9): 117-124.
- [10] KUMAR G, KARTHIK L, RAO K, et al. Larvicidal, ovicidal and repellent activity of *Nerium oleander* leaves against Japanese encephalitis vectors[J]. International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences, 2017, 8(2): 157-162.
- [11] DERWICH E, BENZIANE Z, BOUKIR A. Antibacterial activity and chemical composition of the essential oil from flowers of *Nerium oleander* [J]. Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry, 2010, 9(6): 229-235.
- [12] HUSSAIN M A, GORSI M S. Antimicrobial activity of *Nerium oleander* Linn[J]. Asian Journal of Plant Sciences, 2004, 3(2): 177-180.
- [13] MARIANA A P, MARÍA G O, JOSÉ L C, et al. The antioxidant activity of a prenyl flavonoid alters its antifungal toxicity on *Candida albicans* biofilms[J]. Food and Chemical Toxicology, 2018, 114: 285-291.
- [14] FENG X, WANG C X, WANG H F, et al. Antimicrobial action of flavonoids from *Sedum aizoon* L. against lactic acid bacteria in vitro and in refrigerated fresh pork meat [J]. Journal of Functional Foods, 2018, 40: 744-750.
- [15] 罗洁,王鸿飞,许凤,等. 费菜黄酮对柑橘意大利青霉菌抑制作用的研究[J]. 核农学报, 2020, 34(8): 1737-1745.
- [16] WANG J, YANG C L, WEN T C, et al. Lauric acid induces apoptosis of rice sheath blight disease caused by *rhizoctonia solani* by affecting fungal fatty acid metabolism and destroying the dynamic equilibrium of reactive oxygen species[J]. Journal of Fungi, 2022, 8(2): 153-153.
- [17] OSTROSKY-ZEICHNER L, CASADEVALL A, GALGANI J N, et al. An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond [J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2010, 9(9): 719-727.
- [18] LATGÉ J, BEAUVAIS A, CHAMILOS G. The cell wall of the human fungal pathogen *aspergillus fumigatus*: biosynthesis, organization, immune response, and virulence [J]. Annual Review of Microbiology, 2017, 71(1): 99-116.
- [19] HE J L, WU D T, ZHANG Q, et al. Efficacy and mechanism of cinnamon essential oil on inhibition of *Colletotrichum acutatum* isolated from 'Hongyang' kiwifruit[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1288.
- [20] 方静,谷会,姚全胜,等. 肉桂精油复合聚糖乳液对采后芒果炭疽病的防治效果及作用机制分析[J]. 热带作物学报, 2022, 43(2): 369-376.
- [21] ZHOU L, YUN B Y, WANG Y J. Antibacterial mechanism of emodin on *staphylococcus aureus* [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2011, 27(12): 1156-1160.
- [22] 陈雨晴,吕峰,马志洲. 石菖醇提物基于细胞膜损伤的抑菌作用[J]. 福建农林大学学报, 2021, 50(5): 694-700.



卢环,王成,曾玲玲,等.不同浓度烯效唑浸种对绿豆生理及生长的影响[J].黑龙江农业科学,2023(8):50-57.

不同浓度烯效唑浸种对绿豆生理及生长的影响

卢环,王成,曾玲玲,于运凯,季生栋,徐婷,周超,崔秀辉

(黑龙江省农业科学院 齐齐哈尔分院,黑龙江 齐齐哈尔 161000)

摘要:为提高绿豆产量,解决绿豆生产问题,以绿丰2号为试验材料,用6个浓度的烯效唑浸种,研究烯效唑对绿豆生长及苗期生理指标的影响,筛选出较适宜的3个浓度对3个绿豆品种进行田间试验,探究烯效唑浸种对绿豆生育期、根系、生长指标和产量的影响。结果发现,40 mg·L⁻¹的烯效唑浸种最为适宜,烯效唑浸种可以显著降低绿豆的株高,3个适宜浓度下株高平均降幅为6.3%、13.2%和18.6%;显著增加绿豆根重,3个适宜浓度下根重平均增加16.9%、34.4%和30.5%。烯效唑20和40 mg·L⁻¹处理能显著增加绿豆产量,产量平均增加7.1%和11.7%;并能增加绿豆的分枝、荚数、单株粒重、单株重、根长及侧根数;提高苗期保护酶(SOD和POD)的活性和叶绿素含量,减少MDA含量。

关键词:绿豆;烯效唑;浸种;生理指标;生长性状;产量

绿豆(*Vigna radiata*)具有粮食、蔬菜、绿肥和医药等用途,是中国人民的传统豆类食物^[1]。绿豆适应能力较其他作物强,对逆境环境抵抗能力也较强,对水分、土壤、光照要求都不严苛。绿豆整个生长周期较短,播种时节和区域较宽,并有

固氮养地能力,一般用作补充作物,进行轮作倒茬、间套种或填补小面积地块种植,是禾谷类作物、棉花、薯类间作套种的适宜作物和良好前茬,在农业种植结构调整和高产、优质、高效农业发展中具有其他作物不可替代的重要作用。但绿豆产量较低,是制约绿豆产业发展的主要原因。为提高产量,人们常常过量施用化肥,一旦肥力充足,绿豆营养生长过盛,株高过高,遇风雨灾害必然倒伏,无法机械收获,传统人工收获成本太高,这也是影响绿豆产业的重要原因。选择无公害可控上促下并增产的植物生长调节剂是简便快捷有效解

收稿日期:2023-04-26

基金项目:财政部和农业农村部:国家现代农业产业技术体系(CARS-08-Z09);齐齐哈尔市科技计划创新激励项目(CNYGG-2022044);黑龙江省农业跨越创新工程(GA21B009-09)。

第一作者:卢环(1987—),女,硕士,助理研究员,从事植物生理及杂粮育种研究。E-mail:469512007@qq.com。

通信作者:崔秀辉(1963—),女,硕士,研究员,从事杂粮育种研究。E-mail:zls1963@163.com。

Antibacterial Effects of Flavonoids from Fresh Leaves of *Nerium oleander* L. on *Rhizoctonia solani*

ZHANG Ye,ZHANG Guoliang,HUANG Zhiwei,DENG Jiangxia,LI Bianhao

(College of Life Science and Food Engineering, Huaiyin Institute of Technology, Huai'an 223003, China)

Abstract:In order to study the antibacterial activity of oleander fresh leaves flavonoids on rice blight and the mechanism of action on the cell wall and cell membrane of rice blight, different concentrations of oleander fresh leaves flavonoids were used to treat rice blight fungus to study their effects on the mycelium of rice blight bacteria. The results showed that the minimum inhibitory concentration of oleander fresh leaves flavonoids against blight blight was 4 g·L⁻¹. The scanning electron microscopy results showed that the thickness of the untreated hyphae's thickness was uniform, the surface of the hyphae was smooth and full, and the stretch was good. After the treatment of oleander fresh leaves flavonoids, the hyphae were seriously damaged, the folds were obvious, the inner concave holes were deepened, the cells were ruptured. The activities of chitinase and β-1,3 glucan enzyme were significantly induced. Flavonoids from fresh leaves of *Nerium* significantly affect the permeability of cell membrane of *Rhizoctonia solani*, and a large amount of cell contents were released, which improved the permeability of the cell membrane of pathogenic bacteria and inhibited the synthesis of ergosterol, the structural substance of the membrane, and the longer the action time, the more destructive it was. In summary, it affects its normal physiological function and provides new ideas for effectively preventing rice sheath blight.

Keywords:oleander fresh leaves flavonoids; rice blight; minimum inhibitory concentration; antibacterial mechanism