

苦参黄酮对黄瓜枯萎病及抗性生理的影响

周宝利, 姚 婷, 张 健, 叶雪凌

(沈阳农业大学 园艺学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘要: 采用溶剂萃取法提取苦参活性成分黄酮物质, 研究不同浓度的苦参黄酮对黄瓜枯萎菌菌丝生长、抗病效果及抗性生理的影响。结果表明, 苦参黄酮对黄瓜枯萎菌菌丝表现为各浓度(0.25, 0.5, 1, 2, 4 g/L)下均具有抑制作用, 作用强度随着浓度增加而增强, 4 g/L 苦参黄酮处理, 菌丝抑制率达到 93.08%。在治疗处理中, 连续施用 60 mg/L 苦参黄酮效果最好, 叶绿素含量、根系活力、超氧化物歧化酶(SOD)活性、过氧化物酶(POD)活性和苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性, 分别比对照提高 17.79%, 71.55%, 48.20%, 123.80%, 151.48%, 丙二醛(MDA)含量和相对电导率较对照降低了 60.43%和 40.57%。在预防处理中, 各浓度处理均提高了黄瓜植株的抗病性, 其中以 80 g/L 处理抗病性最强。

关键词: 苦参; 黄酮; 枯萎菌; 抗性生理

中图分类号: S642.2; S482.2.8 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2009)06-0078-05

Effects of Flavonoids of *Sophora flavescens* to *Fusarium* Wilt and Resistance Physiology of Cucumber

ZHOU Bao-li, YAO Ting, ZHANG Jian, YE Xue-ling

(College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: Flavonoids of *Sophora flavescens* were extracted with solvent extraction on mycelial growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, disease resisting effect and resistance physiology with different concentrations were studied. The results showed that all the concentrations (0.25, 0.5, 1, 2, 4 g/L) of flavonoids of *Sophora flavescens* restrained the mycelial growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, and the stimulative rates were enhanced with the increased concentration. As the concentration of flavonoids was 4 g/L, the inhibition rate was 93.08%. In the therapeutic trail, plants have the biggest promotion by 60 g/L flavonoids which results indicated that chlorophyll content, root activity, superoxide dismutase (SOD) activity, peroxidase (POD) activity and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity were increased 17.79%, 71.55%, 48.20%, 123.80%, 151.48% comparing with control. Malondialdehyde (MDA) content and relative conductivity declined 62.33% and 71.14% comparing with control. The results of the prevention trail indicated that flavonoids of *Sophora flavescens* enhanced the disease resistance of cucumber at all the concentrations, and the best effect present in 80 g/L.

Key words: *Sophora flavescens*; Flavonoids; *Fusarium oxysporum* f. sp.; Resistance physiology

黄瓜(*Cucumis sativus* L.)在我国栽培历史悠久, 是深受人民大众喜爱的蔬菜之一。近年来由于设施栽培的广泛应用, 常常出现重茬栽培, 使得黄瓜枯萎病在我国普遍出现, 一般年份发病率为 10%~30%, 严重时可达 80%~90%, 甚至绝产^[1,2], 已成为目前生产上制约黄瓜产量和品质的重要因素之一。农药所导致的社会问题和生态问题受到人们的日益关注, 化学农药的使用和作用遭受到普遍的质

疑, 传统的防治方法会造成抗性(Resistance)再猖獗(Resurgence)和残留(Residue)的 3R 现象^[3], 目前 3R 现象已成为世界公认的亟待解决的难题, 因此人们开始转向研究天然的植物源农药来替代化学合成农药。目前采用植物源农药防治园艺作物真菌和细菌性病害成为国内外研究的热点, 而且许多学者在植物源农药的开发和利用方面进行了大量的工作^[4-9]。植物源农药按照化学成分主要分为生物

收稿日期: 2009-10-27

基金项目: 国家“863”计划资助项目(2004AA247010)

作者简介: 周宝利(1956-), 男, 辽宁绥中人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事蔬菜栽培与生理生态研究。

碱、萜烯类、黄酮类、精油类等^[10]。许多植物提取物,如:原白头翁(*Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel)提取液对小麦赤霉菌(*Fusarium graminearum* Schw.)菌丝有较强的抑制率^[11],丁香(*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. Et Perry)和细辛(*Asarum sieboldii* Miq.)的提取物对番茄灰霉病菌有较强的抑制作用^[12],蛇床子(*Cnidium monnieri* (L.) Cuss.)提取物对茄子黄萎菌菌丝生长抑制作用较强^[13],苦参(*Sophora flavescens* Ait.)提取物对真菌和细菌有显著抑制作用^[14],进一步研究发现苦参黄酮类化合物也具有较强抑菌活性^[15]。本试验基于课题组前期对苦参提取物防治辣椒枯萎菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*)、茄子黄萎菌(*Verticillium dahliae* Kelb)等6种蔬菜病原菌的抑菌试验基础上^[16],进一步采用溶剂萃取法提取苦参活性成分黄酮物质,研究其对黄瓜枯萎病的防治效果及抗性生理的影响,为苦参黄酮生物活性的利用及植物源农药的研制开发提供理论依据,以期更好的指导生产实践。

1 材料和方法

1.1 供试材料

供试材料为苦参(*Sophora flavescens* Ait.)购于沈阳农业大学医院,黄瓜(*Cucumis sativus* L.)品种津春2号,供试菌种黄瓜枯萎病病原菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* Owen.)由沈阳农业大学植保学院提供,试验于沈阳农业大学蔬菜栽培生理与生态实验室内进行。

1.2 材料提取和溶液制备

称取苦参粉末,60%乙醇浸泡6 h(质量:体积=1:10),超声波(50℃,20 kHz,250 W)提取2次,每次30 min,合并滤液,浓缩待用。浓缩液用1/3体积石油醚脱脂,再用等量乙酸乙酯萃取,萃取至乙酸乙酯无色,合并滤液,减压浓缩得总黄酮^[17]。将苦参黄酮配制成预防浓度(Y)和治疗浓度(Z)都为0,20,40,60,80,100 mg/L 6种不同浓度,其中以0 mg/L为对照(CK)。

1.3 室内抑菌试验

实验室内采用菌丝生长速率法测定苦参黄酮对枯萎菌菌丝生长的抑制作用。取经分离纯化的苦参黄酮与冷却至40℃的灭菌PDA培养基混合定容至50 mL,得溶液浓度依次为0.25,0.5,1,2,4 g/L,倒入直径为85 mm的培养皿中,每处理重复3次,以等量50%乙醇PDA平板作为空白对照。在平皿中央接入直径为6.38 mm的供试菌饼,置于25℃恒温培养箱暗培养3~4 d,测定菌落直径,用下列公式计算

抑菌率。采用DPS统计软件以Duncan新负极大差法进行显著性分析。

菌落生长直径(mm)=菌落直径平均值-6.38

抑制率=(对照菌落直径-处理菌落直径)/对照菌落直径×100%

1.4 田间预防试验

试验于2009年2月在沈阳农业大学试验基地温室内进行。常规营养钵育苗,基质栽培,基质为珍珠岩:草炭:蛭石=3:2:1,常规管理。当幼苗长到四叶一心时,选取长势一致的黄瓜幼苗,用不同浓度的苦参黄酮进行灌根处理,每株1 L,处理3次,每次间隔3 d,处理后7 d采用伤根法接种枯萎菌。枯萎菌孢子悬浮液浓度 1×10^7 cfu/mL每株接种100 mL,从田间开始出现病株后,每隔5 d调查一次病情,连续调查5次,计算病情指数和防效。每处理20株,随机排列,3次重复。

1.5 田间治疗试验

当幼苗长到四叶一心时,选取长势一致的黄瓜幼苗进行接菌,接菌方法和预防处理相同。接菌后第3天分别用不同浓度的苦参黄酮进行灌根处理,每株1 L,处理3次,每次间隔3 d。从田间开始出现病株后,每隔5 d调查1次病情,连续调查5次,计算病情指数和防效。每处理20株,随机排列,3次重复。

黄瓜枯萎病病情分级标准:0级:全株无病;1级:发病轻微,全株有1/4以下的叶片出现萎蔫状;2级:发病较重,全株有1/4~1/2的叶片出现萎蔫状;3级:发病重,全株部有1/2以上的叶片出现萎蔫状;4级:因病枯死或接近死亡。

病情指数(%)= $\sum(\text{级数} \times \text{株数})/(\text{最高级数} \times \text{总株数}) \times 100\%$

相对防效=((对照病情指数-处理病情指数)/对照病情指数)×100%

1.6 抗性生理指标测定

当幼苗长到四叶一心时,选取长势一致的黄瓜幼苗,分别用预防和治疗两种处理方式对幼苗进行培养管理,待植株发病后,对黄瓜的叶绿素含量、丙二醛(MDA)含量、细胞膜相对透性、根系活力、超氧化物歧化酶(SOD)活性、过氧化物酶(POD)活性和苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性等指标进行测定。每个处理10株,3次重复。

叶绿素含量采用丙酮和无水乙醇(1:1)的混合浸提液黑暗浸提;丙二醛含量采用硫代巴比妥酸法进行测定;根系活力采用氯化三苯基四氮唑(TTC)法进行测定;细胞膜相对透性采用外渗电导法测定;

超氧化物歧化酶(SOD)活性测定分别采用NBT 染色法^[18];过氧化物酶(POD)活性测定采用愈创木酚染色法^[19];苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性采用苯丙氨酸脱氨显色法^[20]。

2 结果与分析

2.1 苦参黄酮对黄瓜枯萎病菌丝生长的影响

从表 1 可以看出,苦参黄酮提取液各浓度对黄瓜枯萎病菌丝的生长均表现出抑制作用,并随着浓度的增大,抑制作用增强。苦参黄酮提取液浓度为 4 g/L 时,抑制率为 93.08%,与对照相比,抑制率最高,达到极显著水平。

2.2 苦参黄酮对黄瓜枯萎病病情指数的影响

从表 2 可以看出,在治疗处理中 20~100 mg/L 处理的黄瓜苗病情指数均小于对照,表现出不同程度的抗病性,其中 60 mg/L 处理的黄瓜抗病性最强,

浓度高于 60 mg/L 抗病性逐渐减弱。在预防处理中,各浓度处理的病情指数也均小于对照,其中 80 mg/L 处理预防效果最好,防治效果达到 83.66%,浓度高于 80 mg/L 防病效果减弱。

表 1 苦参黄酮对黄瓜枯萎病菌丝生长的影响

Tab.1 Effect of flavonoids of *Sophora flavescens* on the mycelial growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* Owen

浓度/(g/L)	菌丝生长抑制率/%
Concentration	Inhibition rate of mycelium growth
0(CK)	2.64 fF
0.25	69.78 eE
0.5	73.24 dD
1	81.34 cC
2	88.18 bB
4	93.08 aA

注:数字后不同大小写字母分别表示差异达 1%,5% 显著水平。
表 2 同。

Note: Different capital and small letter indicate significant at 1% and 5% level, respectively. The same as Tab. 2.

表 2 苦参黄酮对黄瓜枯萎病的防治效果

Tab. 2 Preventive disease effects of flavonoids of *Sophora flavescens* on cucumber fusarium wilt

浓度/(mg/L)	治疗 Remedy		预防 Prevention	
	病情指数/%	防治效果/%	病情指数/%	防治效果/%
	Disease index	Preventative effect	Disease index	Preventative effect
0(CK)	55.89 aA	—	45.89 aA	—
20	42.63 bB	23.73	35.25 bB	23.79
40	36.12 cC	35.37	21.36 cC	53.45
60	15.78 fF	71.77	15.78 eE	65.61
80	20.89 eE	62.62	7.50 fF	83.66
100	30.33 dD	40.42	30.33 cC	33.91

2.3 苦参黄酮对黄瓜抗性生理的影响

2.3.1 苦参黄酮对黄瓜生理特性的影响 由图 1 可知,在治疗处理中,叶绿素含量呈现出先升高再降低的趋势,当浓度为 60 mg/L 时叶绿素含量最高;在预防处理中,20~80 mg/L 范围内叶绿素含量高于对照(CK),并随处理浓度增加叶绿素含量大幅增加,当浓度为 100 mg/L 时叶绿素含量低于对照。

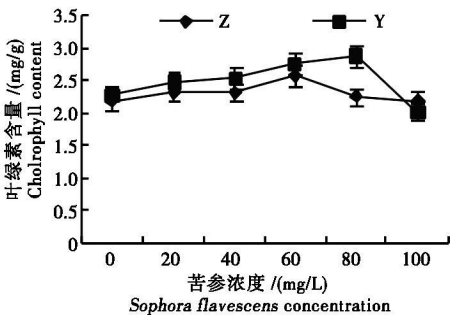


图 1 苦参黄酮处理对叶绿素含量的影响

Fig. 1 Effect of flavonoids on chlorophyll content

由图 2、3 可知,在预防和治理处理中,随着浓度的增加,相对电导率和 MDA 含量都表现出先降低再增加的变化趋势。在治疗和预防处理中,相对电导率和 MDA 含量,分别在 60 mg/L 和 80 mg/L 时最低。

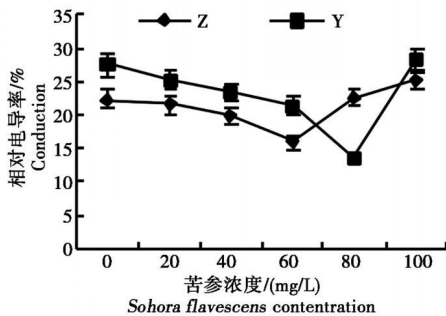


图 2 苦参黄酮处理对相对电导率的影响

Fig. 2 Effect of flavonoids on relative conductivity

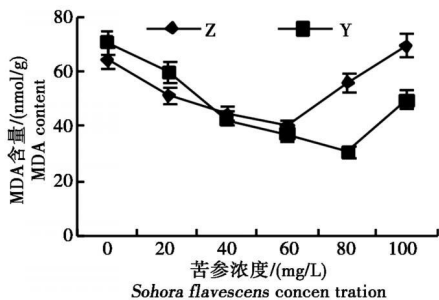


图 3 苦参黄酮处理对 MDA 含量的影响

Fig. 3 Effect of flavonoids on MDA content

由图 4 可知,在治疗处理中,当浓度为 20 mg/L 时,根系活力最弱,当浓度增加到 60 mg/L 时,根系

活力最强。在预防处理中,浓度为 20 mg/L 时,根系活力最弱,当浓度为 80 mg/L 时,根系活力最强。

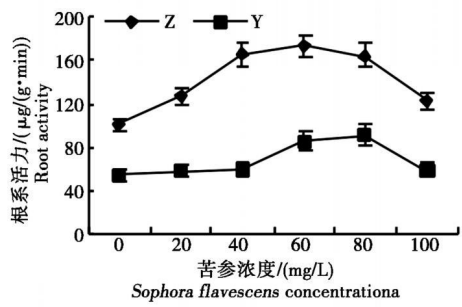


图 4 苦参黄酮处理对根系活力的影响

Fig. 4 Effect of flavonoids on root activity

2.3.2 苦参黄酮对黄瓜体内保护酶(SOD、POD、PAL)活性的影响 由图 5 可知,在治疗处理中,黄瓜体内 SOD 活性高于对照,且随苦参黄酮处理浓度的增加呈现先升高再降低的变化趋势。浓度为 60 mg/L 时 SOD 活性最高,比对照高出 48.20%。在预防处理中,黄瓜体内 SOD 活性均高于对照,80 mg/L 苦参黄酮处理 SOD 活性最高。

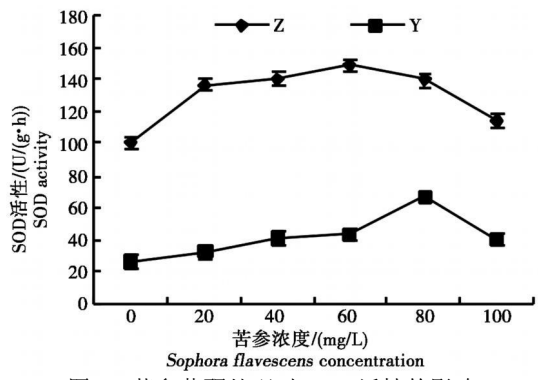


图 5 苦参黄酮处理对 SOD 活性的影响

Fig. 5 Effect of flavonoids on SOD activity

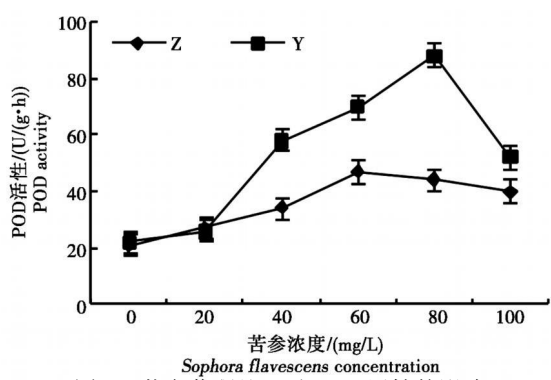


图 6 苦参黄酮处理对 POD 活性的影响

Fig. 6 Effect of flavonoids on POD activity

由图 6 可知,在治疗处理中,POD 活性随着处理浓度的增加呈现先升高再降低的变化趋势,苦参黄酮浓度在 20~60 mg/L 浓度范围时,黄瓜体内 POD 活性均有不同程度的增强,在 60 mg/L 时,POD 活性达到高峰。在预防处理中,各处理间 POD 活性存在显著差异,80 mg/L 苦参黄酮处理 POD 活性最高,比

对照高出 300%,这可能与处理材料和植株本身代谢生理等因素有关。

由图 7 可知,在治疗和预防处理中,苦参黄酮处理后黄瓜体内的 PAL 活性均高于对照,且随着处理浓度的增加,PAL 活性先升高再降低。在治疗处理中,60 mg/L 苦参黄酮处理 PAL 活性最高,比对照高出 151.48%。在预防处理中,80 mg/L 苦参黄酮处理 PAL 活性最高。

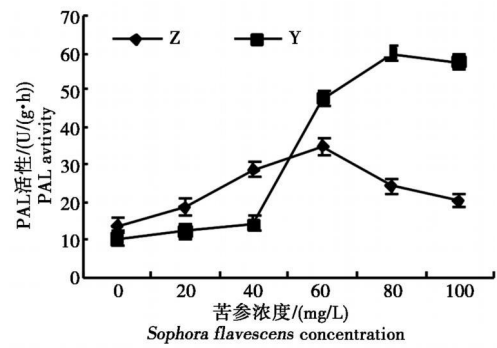


图 7 苦参黄酮处理对 PAL 活性的影响

Fig. 7 Effect of flavonoids on PAL activity

3 讨论与结论

目前,苦参生物碱已经被深入开发,并已经研制出多种生物农药,但在苦参黄酮抑菌方面的研究较少。苦参黄酮类化合物具有较强的生物活性,黄酮类化合物的异戊烯基化可增强其杀虫和抑菌活性^[21]。郑永权等^[14]研究认为苦参中苦参酮和槐属二氢黄酮 G,对金黄色链球菌(*Staphylococcus aureus*)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、葡萄孢(*Botrytis spp*)等 10 种病菌具有抑制作用。研究发现植物提取物可以影响植物生长的各个过程及不同的生理过程,苦参黄酮处理后,改善了辣椒(*Capsicum annuum* L.)植株的生理代谢水平,表现为叶绿素含量增加,根系活力增强,相对电导率和 MDA 含量降低^[22]。甘磷作用下类黄酮含量的下降与甘草磷对苦荞(*Fagopyrum tataricum* L.)中组织伤害有一定的关系^[23]。

本试验中黄酮类物质对黄瓜枯萎菌表现出很强的抑制活性,4 g/L 苦参黄酮处理对菌丝生长抑制率为 93.08%。在治疗试验中,苦参黄酮浓度在 0~60 mg/L 范围时,黄瓜植株的叶绿素含量随着浓度的增加而增加,且浓度为 60 mg/L 时,含量最高。根系活力在浓度为 60 mg/L 时,活力最强。在预防试验中,各指标变化趋势相同,但浓度为 80 mg/L 时出现拐点。黄瓜植株中丙二醛(MDA)含量和细胞膜相对透性的变化说明,低浓度苦参黄酮处理能够提高黄瓜清除活性氧的能力,降低膜脂过氧化程度,提高抗病

性。但处理浓度过大,将影响植物自我调节能力。

近年来,细胞保护酶系统与植物抗病性的关系受到了人们普遍关注。许多植物感病后植株体内抗氧化酶活性的变化与植物抗病性密切相关^[24-25]。黄酮类物质具有很高的抗氧化活性,齐亚娥等^[26]研究发现,玫瑰(*Rosa rugosa* Thunb)花蕾中的黄酮类化合物具有较强的清除—OH 能力。张鹏^[27]在研究银杏叶(*Ginkgo biloba* L.)黄酮的微波提取及其抗氧化性时发现,银杏叶黄酮具有良好的抗氧化作用,是一种天然有效的抗氧化剂。PAL 是植物类黄酮物质合成代谢的起始酶,PAL 活性的增强有助于植物体内黄酮类物质的合成,而黄酮类物质又具有很高的抗氧化活性,它会清除植株体内逆境诱导产生的超氧阴离子自由基。徐建华等^[28]研究黄瓜感染枯萎病后病理组织学时发现,在未感染情况下,抗病品种根部的 PAL、PPO 和 POD 活性比感病品种高。

本试验结果表明,在治疗和预防处理中,黄酮处理后黄瓜体内的 PAL、SOD、POD 活性均呈现出先升高再降低的趋势。在治疗处理中,当苦参黄酮为 60 mg/L 时,PAL、SOD、POD 活性最高。预防处理中,在 80 mg/L 苦参黄酮处理时,PAL、SOD、POD 活性达到高峰。这可能与处理材料和植株本身代谢生理等因素有关。SOD 和 POD 活性变化趋势也均说明,黄酮类物质在一定浓度范围内在植物抵御外来生物的侵袭过程中发挥重要的生理调节作用。苦参黄酮类物质在抑菌与抗氧化两方面协同作用,可增强植株抗病性,这为苦参在农业生产实践中的应用提供理论依据。

参考文献:

[1] 王玲平. 黄瓜感染枯萎病菌后生理生化变化及其与抗病性关系的研究[J]. 太谷: 山西农业大学, 2001.

[2] 刘卮洲, 陈志谊, 刘永锋. 南京地区蔬菜枯萎病菌拮抗细菌的筛选与评价[J]. 江苏农业学报, 2004, 20(1): 18—22.

[3] 刘保才, 王俊琪, 孙国语. 蔬菜病虫害化学防治中的 3R 问题与科学使用农药[J]. 上海蔬菜, 2004(6): 68—69.

[4] Mohamed S, Saka S, El-sharksey S H, et al. Antimycotic screening of 58 Malaysian plants against plant pathogens[J]. Pestic Science, 1996, 47: 259—264.

[5] 吴凤芝, 梦立君, 文景芝. 黄瓜根系分泌物对枯萎病菌菌丝生长的影响[J]. 中国蔬菜, 2002(5): 83—84.

[6] Wang W Q, Ben-daniel B H, Cohen Y. Extracts of *Inula viscosa* control downy mildew caused by *Plasmopara viticola* in

Grapevines[J]. Phytoparasitica, 2004, 32: 208.

[7] 陆志科, 谢碧霞. 不同种竹叶的化学成分及其提取物抗菌活性的研究[J]. 西北林业学院学报, 2005, 20(1): 49—52.

[8] 王文桥, 刘金朵, 张文渊, 等. 植物抗生活性及植物源农药研究进展[J]. 河北农业科学, 2005, 9(4): 74—79.

[9] 杨玉萍, 李艾莲. 植物源杀菌剂研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2006, 8(1): 49—53.

[10] 曲 波, 翟 强. 植物源农药的应用前景[J]. 辽宁农业科学, 2003(3): 36—36.

[11] 吴恭谦. 三种毛茛科植物提取物及原白头翁素的活性研究[J]. 安徽农学院学报, 1989(1): 21—31.

[12] 王树桐. 对番茄灰霉病菌有抗菌活性的植物提取物的室内筛选[J]. 河北农业大学学报, 2003, 26(1): 61—64.

[13] 张淑红, 周宝利, 张 磊, 等. 天然植物提取物对茄子黄萎病菌的抑制活性[J]. 应用生态学报, 2006, 17(6): 1137—1140.

[14] 郑永权, 姚建仁, 邵向东, 等. 苦参杀虫抑菌生物活性的初步研究[J]. 植物保护, 1999, 25(6): 17—19.

[15] Masae Y, Mikkiko K, Shuzo T. The effects of flavonoids on *Staphylococcus aureus* [J]. Phytotherapy Research, 1990, 4(6): 235—236.

[16] 郑玉艳, 周宝利, 张淑红, 等. 不同浓度苦参提取物对蔬菜病原菌的抑菌活性[J]. 植物保护, 2007, 33(5): 121—123.

[17] 司红丽, 王建华, 王越虎. 狗舌草总黄酮的提取及其毒性试验[J]. 畜牧与兽医, 2003, 35(7): 9—10.

[18] 郝建军, 刘延吉. 植物生理学实验技术[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2001: 162—166.

[19] 刘 萍, 李明军. 植物生理学实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 123—125.

[20] 张志安, 陈展宇. 植物生理学实验技术[M]. 吉林人民出版社, 2008: 202—203.

[21] 段泽敏, 王贤萍, 周柏玲, 等. 苹果树腐烂病无公害防治技术研究[J]. 山西农业科学, 2002, 30(4): 55—57.

[22] 郑玉艳, 周宝利, 张淑红. 苦参黄酮对辣椒枯萎病的抑制效应[J]. 沈阳农业大学学报, 2008, 39(3): 297—300.

[23] 董新纯, 赵世杰, 张元湖, 等. 类黄酮在草甘膦诱导的苦荞膜脂过氧化中的作用[J]. 植物保护学报, 2006, 33(4): 412—416.

[24] 张树生, 胡 蕾, 刘忠良, 等. 植物体内抗病相关酶与植物抗病性的关系[J]. 安徽农学通报, 2006, 12(13): 48—49.

[25] 齐亚娥, 吴冬青, 安红钢, 等. 玫瑰花蕾黄酮类化合物提取及清除羟自由基能力[J]. 食品科学, 2007, 32(1): 82—84.

[26] 魏国强, 钱琼秋, 朱祝军. 黄瓜白粉病抗性及其生理机制的研究[J]. 华北农学报, 2004, 19(2): 84—86.

[27] 张 鹏. 银杏叶黄酮的微波提取及其抗氧化性研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(12): 5496—5497.

[28] 徐建华, 王建波, 利容千. 黄瓜感染枯萎病后病理组织学的研究[J]. 植物病理学报, 1997, 27(4): 349—352.