

DOI:10.11686/cyxb2024157

http://cyxb.magtech.com.cn

董拓轩, 陈训锋, 梅大海, 等. 纳米铁与铜对苜蓿壳二孢及其引致春季黑茎病的抑制与防治作用. 草业学报, 2025, 34(4): 201-211.

DONG Tuo-xuan, CHEN Xun-feng, MEI Da-hai, et al. Inhibition and control effect of nano-iron and copper on *Ascochyta medicaginicola* and spring black stem disease. Acta Prataculturae Sinica, 2025, 34(4): 201-211.

纳米铁与铜对苜蓿壳二孢及其引致春季黑茎病的抑制与防治作用

董拓轩^{1,2}, 陈训锋^{1,2}, 梅大海^{1,2}, 郭永莎^{1,2}, 魏旭红^{1,2}, 宋秋艳^{1,2*}

(1. 兰州大学草地农业科技学院, 甘肃 兰州 730020; 2. 草种创新与草地农业生态系统全国重点实验室, 甘肃 兰州 730020)

摘要: 紫花苜蓿是我国乃至世界上栽培面积最大的豆科牧草, 由苜蓿壳二孢引致的春季黑茎病, 是我国紫花苜蓿五大病害之一。纳米铜(Cu NPs)、纳米氢氧化铜[Cu(OH)₂ NPs]、纳米铁(Fe NPs)和具有核壳结构的纳米铁(Core-shell Fe NPs)对苜蓿壳二孢显示不同程度的抑菌作用, 其中Cu NPs的抑制效果显著(400 mg·L⁻¹抑制率达到74.1%); Cu NPs对苜蓿春季黑茎病具有显著的防效(先接种Cu NPs和先接种孢子悬浮液再接种Cu NPs这两种处理方式的相对病斑面积分别为5.95%和8.75%); 提前施加Cu NPs悬浮液紫花苜蓿叶片的相对电导率为18.11%, 而接种苜蓿壳二孢处理之后叶片的相对电导率达到82.27%; Cu NPs处理的紫花苜蓿相较只接菌处理其超氧化物歧化酶(SOD)、苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性显著下降, 使多酚氧化酶(PPO)活性提高42.6%, 过氧化氢酶(CAT)活性在先接种Cu NPs处理中下降45.8%; 超微结构观察到Cu NPs处理的叶片中苜蓿壳二孢孢子细胞膜被刺穿破损, 叶片叶绿体类囊体层次分明, 细胞膜完整。本研究为Cu NPs防治苜蓿春季黑茎病提供理论依据。

关键词: 紫花苜蓿; 纳米铜; 苜蓿壳二孢; 抑制; 防治

Inhibition and control effect of nano-iron and copper on *Ascochyta medicaginicola* and spring black stem disease

DONG Tuo-xuan^{1,2}, CHEN Xun-feng^{1,2}, MEI Da-hai^{1,2}, GUO Yong-sha^{1,2}, WEI Xu-hong^{1,2}, SONG Qiu-yan^{1,2*}

1. College of Pastoral Agriculture Science and Technology, Lanzhou University, Lanzhou 730020, China; 2. State Key Laboratory of Herbage Improvement and Grassland Agro-ecosystems, Lanzhou 730020, China

Abstract: Alfalfa (*Medicago sativa*), the most extensively cultivated leguminous forage in China and globally, is susceptible to spring black stem disease caused by *Ascochyta medicaginicola*, one of the five most devastating diseases of alfalfa in China. Among various nanoparticles tested for their antifungal properties against *A. medicaginicola*, copper nanoparticles (Cu NPs) demonstrated the most pronounced inhibitory effect, with an inhibition rate of 74.1% at a concentration of 400 mg·L⁻¹. The application of Cu NPs also significantly mitigated the impact of spring black stem disease on alfalfa, reducing the relative lesion area to 5.95% when applied prior to inoculation with a spore suspension, and to 8.75% when applied after inoculation with a spore suspension. When alfalfa leaves were pre-treated with a Cu NPs suspension, the relative conductivity was only 18.11%, contrasting

收稿日期: 2024-04-30; 改回日期: 2024-07-29

基金项目: “十四五”重点研发计划(2023YFD1301202, 2022YFD1300802), 甘肃省自然科学基金(23JRRA1076), 国家自然科学基金(31901388), 国家现代农业产业技术体系(CARS-34)和兰州大学中央高校基本科研业务费(lzujbky-2024-ou15)专项资金资助。

作者简介: 董拓轩(2003-), 男, 甘肃兰州人, 在读本科。E-mail: dongtx21@lzu.edu.cn

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: sqy@lzu.edu.cn

sharply with the 82.27% relative conductivity of alfalfa leaves inoculated with a spore suspension only. The enzymatic responses in Cu NPs-treated alfalfa were notable, with a significant decrease in the activities of superoxide dismutase and phenylalanine ammonia-lyase compared with the spore-inoculated control group. Conversely, the activity of polyphenol oxidase was increased by 42.6%, while catalase activity decreased by 45.0% in the first Cu NPs inoculation treatment. Ultrastructural analyses revealed that Cu NPs punctured and caused visible damage to the cell membrane of *A. medicaginicola* within alfalfa leaves. In contrast, the chloroplast thylakoids in the treated leaves remained clearly layered, indicating that alfalfa cell membrane integrity remained intact. These findings offer valuable insights into the potential use of Cu NPs as a control measure for alfalfa spring black stem disease.

Key words: *Medicago sativa*; Cu NPs; *Ascochyta medicaginicola*; inhibition; control effect

紫花苜蓿(*Medicago sativa*),作为豆科牧草的重要代表,不仅在我国拥有广泛的栽培面积,而且在全球范围内也占据显著地位。然而,病害一直是影响其产量的主要因素^[1]。其中,由苜蓿壳二孢(*Ascochyta medicaginicola*)引发的春季黑茎病,不仅在我国被列为紫花苜蓿的五大主要病害之一,还因其广泛的分布和危害性,被公认为世界性的病害问题^[2]。苜蓿春季黑茎病致使叶片、叶柄和茎上出现不规则形的黑色、深褐色病斑,伴有的淡黄色晕圈,苜蓿叶片病斑面积逐步扩大,可造成苜蓿草产量损失达19%~40%,其叶片粗蛋白含量降低22%以上^[3]。因此,亟须推进紫花苜蓿春季黑茎病防治方法的研究。

传统研究中,大量依靠化学杀菌剂抵御真菌病害,但这种防御方式的处理对象通常不局限于病原真菌,对环境中的土壤、水质、空气和微生物等均易造成不良影响。纳米材料作为一种新兴技术,除了在医疗领域已有广泛的用途外,在农业应用领域也取得了显著进展,可促进种子发芽、植物生长和发育,并具有抗病作用^[4]等。如喷施一定浓度纳米硒可有效促进紫花苜蓿产量^[5],硅铝纳米颗粒有效抑制引起番茄(*Solanum lycopersicum*)根腐病的茄腐镰孢菌(*Fusarium solani*)^[6]。银纳米颗粒已被用于防治多种病害,如枯萎病^[7]、鞘枯病^[8]、鹰嘴豆(*Cicer arietinum*)感染的尖孢镰刀菌^[9]等;纳米二氧化硅对西瓜(*Citrullus lanatus*)镰刀菌枯萎病具有抑制作用^[10-11]。铜纳米颗粒对辣椒(*Pusa jwala*)炭疽病菌(*Colletotrichum capsici*)的抑制作用结果表明 500 mg·L⁻¹ 纳米铜对菌丝的抑制效果超过其他相关试剂^[12]。纳米氧化铜有效激活一系列防御酶,使烟草(*Nicotiana tabacum*)中的抗性基因表达更充分^[13]。纳米氧化锌处理的水稻(*Oryza sativa*)种子抗氧化酶活性提高^[14],抑制感染木瓜(*Carica papaya*)胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)分生孢子的萌发^[15]。

病原真菌侵染植物后,会对植物抗氧化酶系统产生影响。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、苯丙氨酸解氨酶(L-phenylalanine ammonia-lyase, PAL)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)和过氧化物酶(peroxidase, POD)是植物体内重要的防御酶,POD可催化产生过氧化氢氧化酚类和胺类化合物、SOD催化超氧化物阴离子发生歧化作用、CAT是最主要的过氧化氢清除酶,三者活性氧清除系统中扮演重要角色。PPO是一种含铜的氧化酶,主要负责对酚类物质的氧化,形成对病原菌有毒的醌类物质,从而杀死病原菌^[16],含量升高时,对病原菌的抵抗力增强^[17]。PAL是植物体内苯丙烷类代谢的关键酶和限速酶,直接或间接参与植物体内黄酮等多种次生代谢物的合成。SOD、CAT、POD酶活性在接种病原真菌后先升高随后急剧下降,致使活性氧积累,加速植物死亡^[3];PPO酶活性在侵染初期最强,后期随着病害加重酶活性逐步降低,表明植物自身对病害抵抗能力也较为有限。众多研究表明纳米材料可以帮助植物抗氧化酶更好的抵御病原真菌侵袭,利用腊肠树(*Cassia fistula*)合成的纳米氧化铜随着浓度升高增强番茄地上部分PPO、CAT等酶活性,同时有效抑制番茄枯萎病尖孢镰刀杆菌(*Fusarium oxysporum*)^[18],带正电荷的纳米Ag/SiO₂复合材料在抑制蚕豆(*Vicia faba*)灰霉菌(*Botrytis cinerea*)时也可激活PPO酶活性^[19]。以上结果表明,纳米材料具有改变抗氧化酶系统增强植物抵抗能力和绿色防控植物病害的应用潜能。

本研究拟探究纳米铁和铜对壳二孢的抑菌作用及该菌引发的苜蓿春季黑茎病的防治效果,以期为紫花苜蓿春季黑茎病绿色防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究使用国内紫花苜蓿品种(甘农1号, Gannong No. 1)作为试验材料,由甘肃农业大学提供。试验所用纳米材料[Cu NPs、Fe NPs和Cu(OH)₂ NPs]购自北京中科言诺纳米材料公司,材料规格35~45 nm,纯度99%,浓度1000 mg·L⁻¹及具有核壳结构的纳米Fe(简称核壳Fe NPs)由甘肃省科学院提供^[20]。植物病原真菌苜蓿壳二孢由兰州大学草地农业科技学院草种创新与草地农业生态系统全国重点实验室提供。

1.2 试验方法与步骤

1.2.1 筛选活性纳米材料 本研究于2023年3月—2024年2月于兰州大学草地农业科技学院进行。配制马铃薯(*Solanum tuberosum*)葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar, PDA),将200 g马铃薯、20 g琼脂和20 g葡萄糖用无菌水定容至1 L,使用高压灭菌锅121 °C灭菌30 min,倒入培养皿后冷却凝固。使用PDA培养基活化苜蓿壳二孢,再将纳米材料配制为药液,加入PDA培养基中,接种菌饼,通过菌丝抑制法分析4种纳米材料抑菌效果,筛选出对苜蓿壳二孢抑制作用强的纳米材料,将其视为活性纳米材料,苜蓿壳二孢经过接种、纯化培养在25 °C的PDA培养基上,在黑暗的恒温培养箱中培养7 d,获得接种物。

不同纳米材料加入非离子表面活性剂,制得浓度均一的纳米材料悬浮液,按表1配置改良版PDA培养基(每20 mL倒入3个直径6 cm的培养皿),获得浓度为300 mg·L⁻¹的纳米PDA培养基。将菌饼接入培养基中在25 °C的黑暗培养箱培养9 d,用十字交叉法^[13]测量菌落直径,并校正,计算抑菌百分率,每种处理重复3次。

菌丝生长直径(mm)=两次直径平均值-4.0(菌饼直径)

菌丝生长抑制率(%)=(对照菌落生长直径-处理菌落生长直径)/对照菌落生长直径×100%

1.2.2 活性纳米材料在不同浓度下对苜蓿壳二孢的抑制作用 对1.2.1中筛选出的活性纳米材料悬浮液用无菌水稀释到下列浓度梯度:400、200、100、50、25 mg·L⁻¹,接种所用PDA培养基(每20 mL倒入3个直径6 cm的培养皿)配比见表2。

使用1.2.1中培养的壳二孢,按上述方法培养9 d。用相同方法统计处理,以纳米材料浓度的对数和抑制率值拟合曲线,计算抑制菌丝生长50%的活性纳米材料浓度(半最大效应浓度,EC₅₀)。每种处理重复3次。

1.2.3 活性纳米材料对紫花苜蓿春季黑茎病的防效 紫花苜蓿(甘农1号)种子先用75%乙醇灭菌3 min,无菌水冲洗3遍,然后在1%次氯酸钠中浸泡2 min,再用无菌水冲洗3遍。然后,将种子种植到含有灭菌土壤、体积为30 cm×30 cm×40 cm的花盆中,培养42 d,选取生长状况接近的紫花苜蓿叶片用于试验。

将1.2.1中培养好的苜蓿壳二孢菌丝用无菌水

表1 不同纳米材料的培养基配方

Table 1 Media formulations for different nanomaterials

成分 Ingredients	配比 Ratio
马铃薯 Potatoes (g)	4.0
无水葡萄糖 Anhydrous glucose (g)	0.4
琼脂 Agar (g)	0.4
纳米材料悬浮液 Nanomaterial suspension (1000 mg·L ⁻¹ , mL)	6.0
无菌水 Sterile water (mL)	14.0

表2 不同浓度梯度Cu NPs培养基配方

Table 2 Formulations of Cu NPs medium with different concentration gradients

浓度 Concentration (mg·L ⁻¹)	马铃薯 Potatoes (g)	无水葡萄糖 Anhydrous glucose (g)	琼脂 Agar (g)	纳米材料悬浮液 Nanomaterial suspension (1000 mg·L ⁻¹ , mL)	无菌水 Sterile water (mL)
0(空白CK)	4.0	0.4	0.4	0	20.0
25	4.0	0.4	0.4	8.0	12.0
50	4.0	0.4	0.4	4.0	16.0
100	4.0	0.4	0.4	2.0	18.0
200	4.0	0.4	0.4	1.0	19.0
400	4.0	0.4	0.4	0.5	19.5

冲洗、过滤并稀释至 40 mL,加入吐温 80 制得苜蓿壳二孢孢子悬浮液,观察统计孢子浓度并稀释浓度为 1.0×10^6 个 \cdot mL $^{-1}$ 。

将选出的活性纳米材料稀释至 400 mg \cdot L $^{-1}$ 后制得纳米悬浮液,使用无菌针头对叶面中心叶脉横向刺破。为了探究活性纳米材料对叶片先喷洒是否有提前预防感病以及感病后再施加纳米材料是否对叶片有发病遏制的效果,按照表 3 所示方法处理紫花苜蓿叶片,试验活性纳米材料“防”与“治”的效果。

表 3 叶片处理方式

Table 3 Blade treatment

处理方式 Treatment	接种顺序 Vaccination sequence
空白 CK	无菌水 Sterile water (5 mL)→无菌水 Sterile water (5 mL)
接菌 Fungal inoculation	孢子悬浮液 Spore suspensions (5 mL)→无菌水 Sterile water (5 mL)
先注射菌→再注射纳米铜 Inoculation of fungi→reinoculation with Cu NPs	孢子悬浮液 Spore suspensions (5 mL)→纳米铜悬浮液 Cu NPs suspension (5 mL)
先注射纳米铜→再注射菌 Inoculation of Cu NPs→reinoculation with fungi	纳米铜悬浮液 Cu NPs suspension (5 mL)→孢子悬浮液 Spore suspensions (5 mL)

1.3 叶片病斑面积测定

选用不同处理的紫花苜蓿叶片,记录图片数据并使用 Image-Pro Plus 软件测定叶片病斑面积和叶片表面积,将二者比值称为相对病斑面积,进行统计分析。

1.4 相对电导率测定

植物细胞膜受损的大小可以用相对电导率(relative conductivity, REC)来表示,使用电导率仪(雷磁, DDSJ-319L, 中国)测定不同处理叶片的相对电导率,对植物叶片细胞膜受损程度进行测定。

1.5 防御酶活性测定

感病后第 9 天使用试剂盒测定处理叶片的过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)、苯丙氨酸解氨酶(PAL)、多酚氧化酶(PPO)和过氧化物酶(POD)活性,操作方法参照试剂盒使用说明书,试剂盒均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.6 叶片超微结构测定

透射电镜观察叶片内部结构及接种孢子形态。将叶片接种部位切成 1 mm \times 3 mm \times 1 mm 大小,对叶片抽取真空并放入常温 2.5% 戊二醛磷酸钠缓冲液(100 mmol \cdot L $^{-1}$, pH 7.4, 成都科隆化学品有限公司)中固定,之后 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜,分多次用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS, 成都科隆化学品有限公司)冲洗。送样至兰州大学电镜中心处理,进行透射电镜观察,在 80 kV 加速电压下、HC-1 高反差模式的透射电镜上进行检测。

1.7 统计分析

用 Excel 2021 进行数据记录。使用 SPSS 26.0 统计分析软件(IBM, 美国),通过单因素方差分析(analysis of variance, ANOVA)和 Duncan's 多重比较法分析和处理数据,使用 Origin 2021、Image-Pro Plus 进行制图。

2 结果与分析

2.1 不同纳米材料对苜蓿壳二孢生长的抑制作用

分别采用浓度为 300 mg \cdot L $^{-1}$ 的 Cu NPs、Cu(OH) $_2$ NPs、Fe NPs、核壳 Fe NPs 这 4 种纳米材料对菌丝生长的直径做对照试验(图 1),采用十字交叉法测定菌丝生长直径,菌丝在接种后 2~4 d 生长速度较快(图 2)。与未处理样品相比,经核壳 Fe NPs 处理后在第 9 天差异不显著,菌丝生长明显不受其影响,Fe NPs 的菌丝生长抑制率为 17.95%。然而,在 Cu NPs 与 Cu(OH) $_2$ NPs 处理后,菌丝直径显著下降($P < 0.05$),对菌丝的抑制率分别达到了 49.54% 和 40.07%(图 3),且菌丝呈生长停滞的现象,抑菌效果明显。基于此,选用抑菌效果最为显著的 Cu NPs 作为活性纳米材料进行浓度梯度试验。

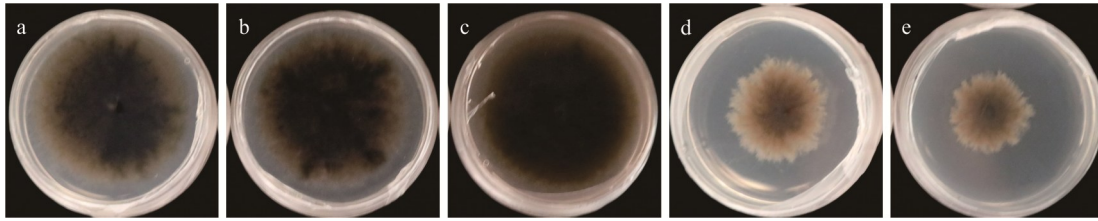


图 1 不同纳米材料处理后第 9 天菌丝生长情况

Fig. 1 Mycelial growth after treatment with different nanomaterials on 9th day

a: 空白对照 Blank control (CK); b: 纳米铁 Fe NPs; c: 核壳纳米铁 Core-shell Fe NPs; d: 纳米氢氧化铜 Cu(OH)₂ NPs; e: 纳米铜 Cu NPs.

2.2 活性纳米材料抑菌试验

对 2.1 中选出的活性纳米材料 Cu NPs 进行浓度梯度试验,接种 2 d 后采用十字交叉法测量菌丝直径,不同浓度 (>25 mg·L⁻¹) 的 Cu NPs 对菌丝均有显著抑制效果(图 4,图 5)。在接种第 9 天时 25 和 50 mg·L⁻¹ 的 Cu NPs 对菌丝生长抑制率为 9.55% 和 9.10%,50 mg·L⁻¹ 的抑制效果略低于 25 mg·L⁻¹,50 mg·L⁻¹ 浓度菌丝生长更为成熟(图 4e,f)。100 和 200 mg·L⁻¹ 的菌丝抑制率为 17.29% 和 18.63%,对比 25 和 50 mg·L⁻¹ 的抑制效果显著提高($P < 0.05$)。400 mg·L⁻¹ 浓度的抑制效果最为显著,菌落直径比空白培养基减少 27 mm,菌丝生长抑制率达到 74.10%(图 6),菌丝的生长得到遏制。

根据不同浓度 Cu NPs 的菌丝生长抑制率,构建非线性回归方程拟合抑制率曲线,以 Cu NPs 浓度的对数作为横坐标,菌丝生长抑制率对照生物统计概率换算为抑制值为纵坐标,在 Origin 2021 软件使用非线性指数 exponential 拟合得到毒力回归方程(图 7),得到抑制率为 50% 时的纳米 Cu 浓度为 331 mg·L⁻¹ (EC₅₀)。

2.3 活性纳米材料对紫花苜蓿春季黑茎病的防治效果

试验中使用孢子悬浮液和 Cu NPs 悬浮液处理的先后顺序不同形成 3 种处理方式来检验活性纳米材料对于紫花苜蓿叶片“防”与“治”的效果。

2.3.1 对叶片病斑面积的影响

对不同处理方式的叶片测定其病斑面积和叶面积(图 8),二者比值为相对病斑面积(图 9),可以看出只接种苜蓿壳二孢的叶片相对病斑面积达到 21.79%,而先接种 Cu NPs 再接菌和先接种孢子悬浮液再接种 Cu NPs 这两种处理的相对病斑面积分别为 5.95% 和 8.75%,相比只接菌处理显著下降($P < 0.05$),展现了 Cu NPs 的治病效果。

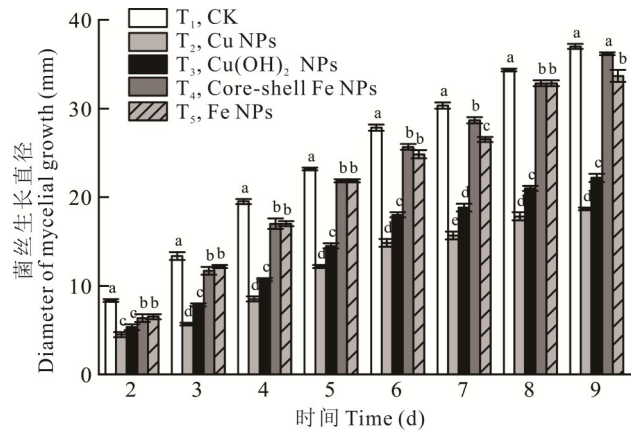


图 2 不同纳米材料处理后菌丝生长直径

Fig. 2 Diameter of mycelium growth after treatment with different nanomaterials

不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平差异显著,下同 Different lowercase letters indicate significant differences at $P < 0.05$ level, the same below. T₁: 空白对照 Blank control (CK); T₂: 纳米铜 Cu NPs; T₃: 纳米氢氧化铜 Cu(OH)₂ NPs; T₄: 核壳纳米铁 Core-shell Fe NPs; T₅: 纳米铁 Fe NPs.

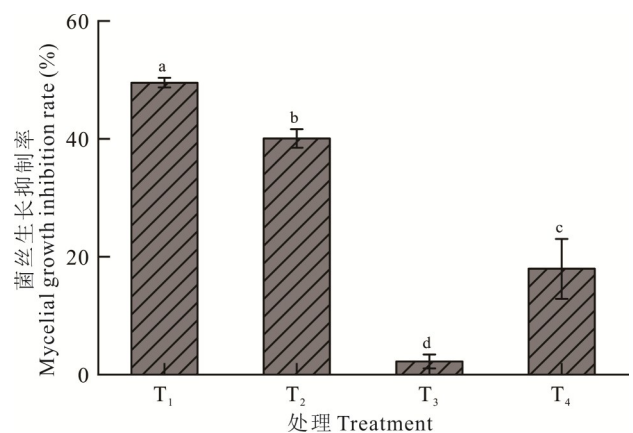


图 3 第 9 天不同纳米材料菌丝生长抑制率

Fig. 3 Inhibition rate of mycelial growth of different nanomaterials on 9th day

T₁: 纳米铜 Cu NPs; T₂: 纳米氢氧化铜 Cu(OH)₂ NPs; T₃: 核壳纳米铁 Core-shell Fe NPs; T₄: 纳米铁 Fe NPs.

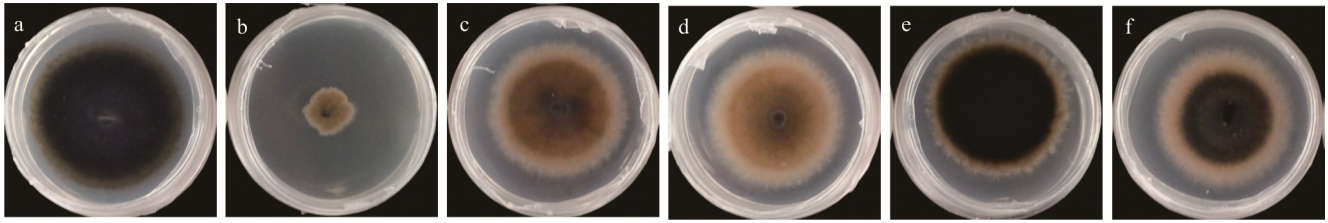


图4 不同浓度Cu NPs处理后第9天菌丝生长情况

Fig. 4 Mycelial growth after treatment with different concentrations of Cu NPs on 9th day

a: 空白对照 Blank control; b: 400 mg·L⁻¹; c: 200 mg·L⁻¹; d: 100 mg·L⁻¹; e: 50 mg·L⁻¹; f: 25 mg·L⁻¹.

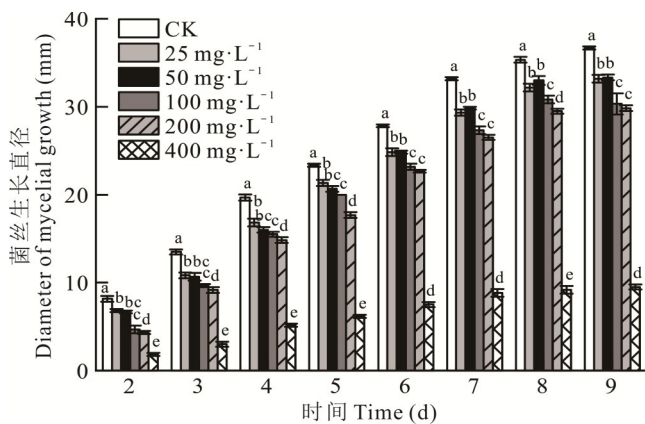


图5 不同浓度Cu NPs处理后菌丝生长直径

Fig. 5 Diameter of mycelium after treatment with different concentrations of Cu NPs

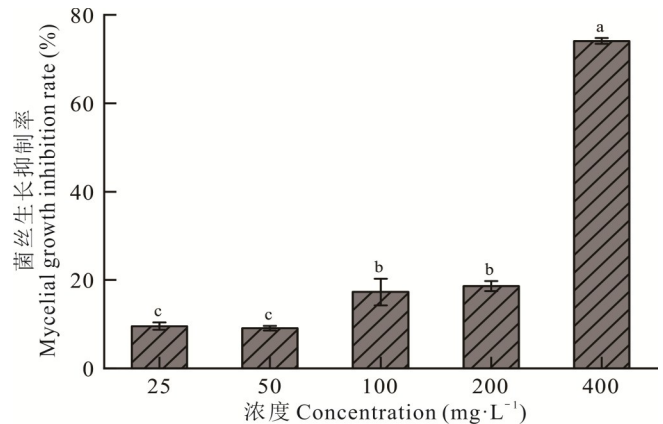


图6 第9天不同浓度Cu NPs菌丝生长抑制率

Fig. 6 Inhibition rate of mycelial growth of Cu NPs at different concentrations on 9th day

2.3.2 对相对电导率的影响 紫花苜蓿叶片处理后第5天测定植物相对电导率,在只接种苜蓿壳二孢孢子悬浮液的情况下,相对电导率达到82.27%,叶片细胞膜的通透性大幅增加,叶片受损程度较大(图10)。先对叶片接种孢子悬浮液使得叶片出现发病情况后喷洒400 mg·L⁻¹ Cu NPs悬浮液,相对电导率显著降低至62.20%,叶片受损程度降低。而提前施加Cu NPs悬浮液的预防效果则更为显著($P < 0.05$),相对电导率仅为18.11%,表现为大幅降低,叶片细胞膜功能较为完整。从此可以初步推断Cu NPs的相对防治效果更为优异。

2.3.3 对防御酶活性的影响 本试验采用的紫花苜蓿品种(甘农1号)对苜蓿壳二孢诱发的春季黑茎病与叶斑病表现为高抗性品种。试验测定了不同处理的超氧化物歧化酶(SOD)、苯丙氨酸解氨酶(PAL)、过氧化氢酶(CAT)、多酚氧化酶(PPO)和过氧化物酶(POD)的活性(图11)。

SOD相比于对照组,只接种孢子悬浮液的处理叶片SOD酶活性最高,达到 $0.47 \text{ U} \cdot 10^{-4} \text{ cell}$,2个接种Cu NPs悬浮液的处理酶活性相比于只接菌和对照组均显著下降($P < 0.05$)。PPO中接种Cu NPs的两种处理酶活性与对照组接近,但只接菌组则显著下降,仅有 $0.041 \text{ U} \cdot 10^{-4} \text{ cell}$ 。相比对照组,其他3种处理的POD酶活性均显著下降($P < 0.05$),三者间差异不显著($P > 0.05$)。3种处理同样导致PAL酶活性显著下降,但是接种Cu NPs悬浮液的两个处理组下降更为显著。相比于

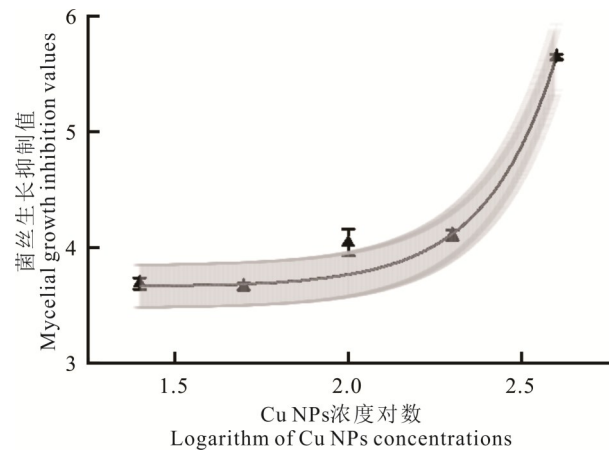


图7 第9天不同浓度Cu NPs菌丝生长抑制率拟合曲线

Fig. 7 Fitting curves of growth inhibition rate of Cu NPs hyphae at different concentrations on 9th day

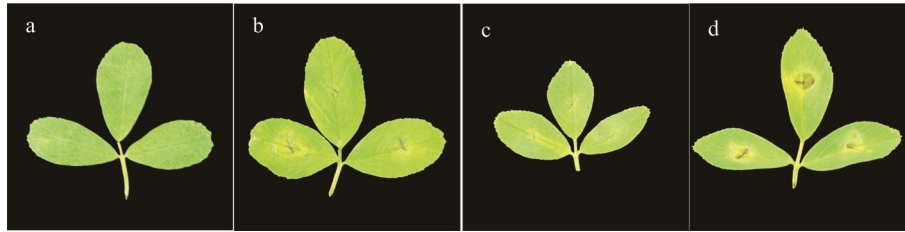


图 8 不同处理下叶片病斑

Fig. 8 Leaf lesions under different treatments

a: 空白对照 Blank control; b: 先接菌→再接 Cu NPs Inoculation of fungi→reinoculation with Cu NPs; c: 先接 Cu NPs→再接菌 Inoculation of Cu NPs→reinoculation with fungi; d: 只接种菌 Fungal inoculation only.

对照组(CK), 3种处理CAT酶活性上升, 先接Cu NPs、再接菌的一组酶活性上升至 $0.09 \text{ U} \cdot 10^{-4} \text{ cell}$, 其他两组上升则更为显著, 但组间差异不显著($P > 0.05$)。

2.3.4 对叶片与壳二孢超微结构的影响 对Cu NPs悬浮液和苜蓿壳二孢孢子悬浮液处理的紫花苜蓿叶片细胞进行透射电镜成像, 观察细胞超微结构。在叶片观察到苜蓿壳二孢孢子, 图12a、b均为先接种Cu NPs, 再接种孢子悬浮液的图片, 图12a中发现Cu NPs刺穿了孢子的细胞膜(黄色箭头), 该种处理发现壳二孢孢子多个部位发生空化和细胞膜损伤(紫色箭头), 表明苜蓿壳二孢出现明显损坏。Cu NPs聚集物明显附着在孢子周围。图12c为仅接种孢子的叶片, 孢子整体结构完整, Cu NPs同样发生聚集现象(图12d), 孢子细胞膜已经被明显破坏, 呈现半裸露状态(绿色箭头)。

观察紫花苜蓿叶片的超微结构, 着重观察叶片的叶绿体, 发现大部分叶绿体结构完整, 处于较为健康的状态, 孢子造成的损伤有限。图13b为仅接种孢子悬浮液处理, 发现大部分叶绿体都出现不同程度的损伤, 叶绿体外膜已出现明显损伤(红色箭头)。

3 讨论

纳米材料具有良好的绿色防控植物病害的应用潜能。 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的Ag NPs有效抑制感染多年生黑麦草(*Lolium perenne*)的麦根腐平脐蠕孢(*Bipolaris sorokiniana*)^[21], $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的Cu NPs帮助减少辣椒炭疽病^[12]。在本研究中, 测试4种纳米材料[Cu NPs、Cu(OH)₂ NPs、Fe NPs、核壳Fe NPs]对苜蓿壳二孢的抑制效果。从菌丝生长抑制率来看, Cu NPs对苜蓿壳二孢的抑制效果最为显著($P < 0.05$), 接种第9天对菌丝抑制率达到49.54%, Cu(OH)₂ NPs抑制效果紧随其后。在试验中, 铜基纳米材料对病原真菌呈现出很好的抑菌效果, 在大量的报道中, 铜基纳米材料的抑菌效果已

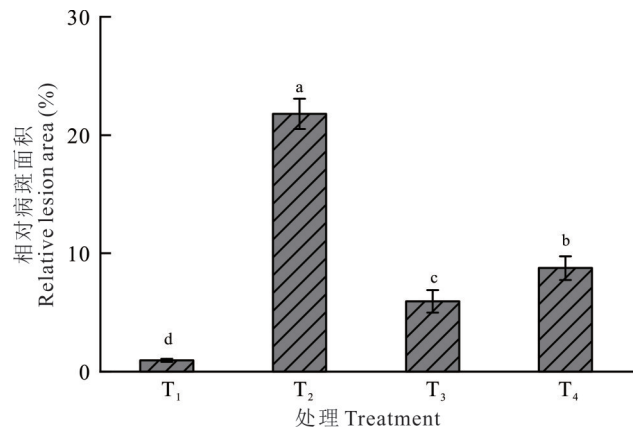


图 9 不同处理下叶片相对病斑面积

Fig. 9 Relative lesion area of leaves under different treatments

T₁: 空白对照 Blank control; T₂: 只接种菌 Fungal inoculation only; T₃: 先注射 Cu NPs→再注射菌 Inoculation of Cu NPs→reinoculation with fungi; T₄: 先注射菌→再注射 Cu NPs Inoculation of fungi→reinoculation with Cu NPs. 下同 The same below.

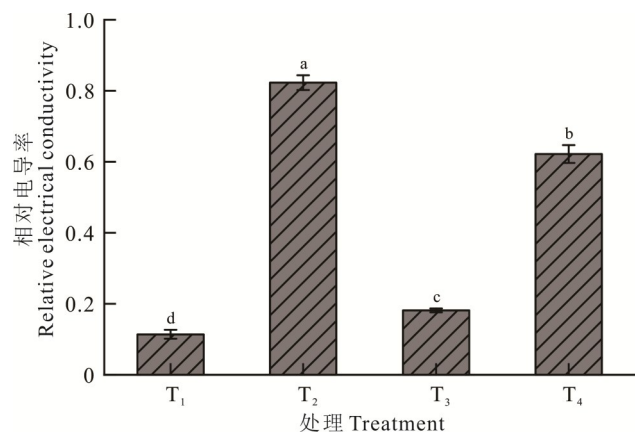


图 10 不同处理下叶片相对电导率

Fig. 10 Relative conductivity of blades under different treatments

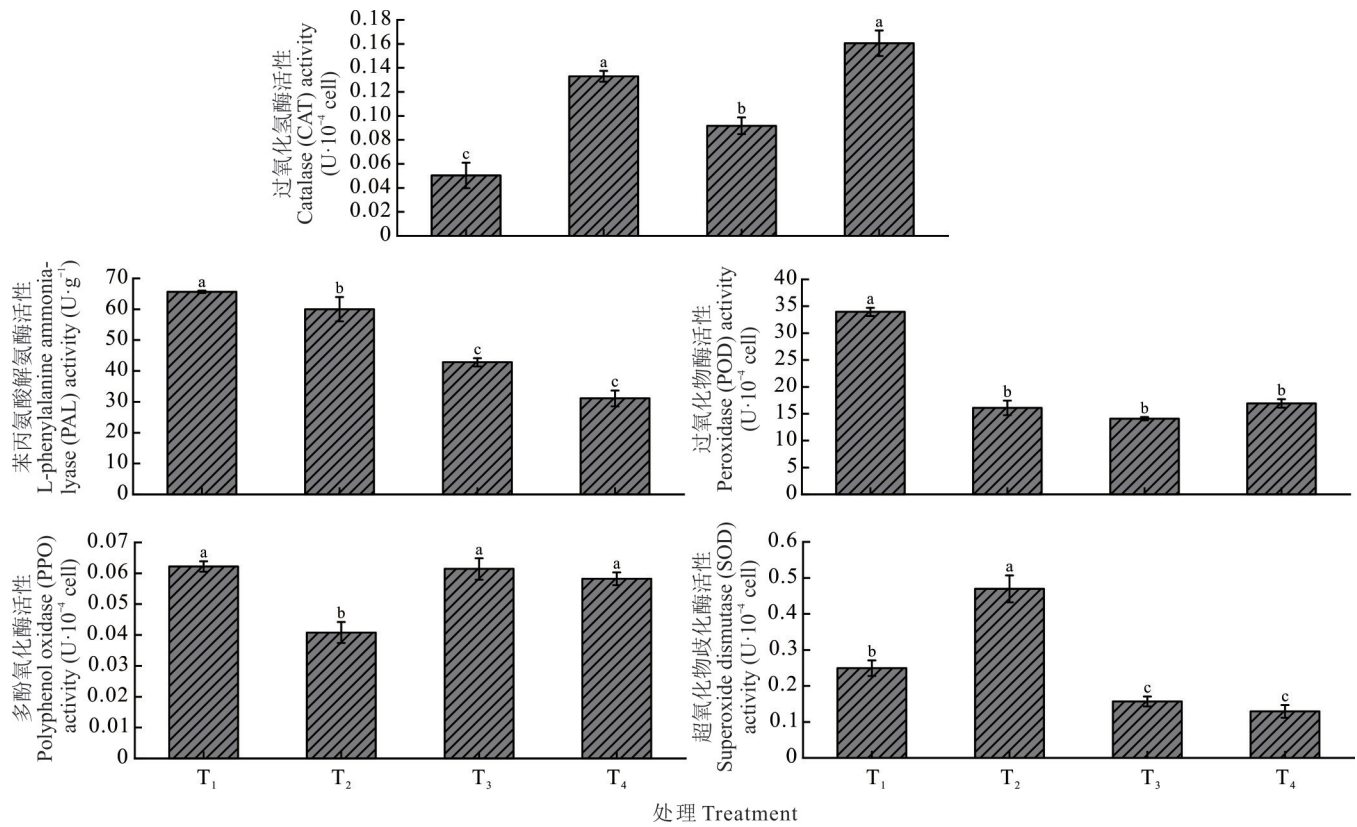


图 11 不同处理下叶片超氧化物歧化酶、苯丙氨酸解氨酶、过氧化氢酶、多酚氧化酶和过氧化物酶活性

Fig. 11 Superoxide dismutase (SOD), L-phenylalanine ammonia-lyase (PAL), catalase (CAT), polyphenol oxidase (PPO), peroxidase (POD) enzyme activity in leaves under different treatments

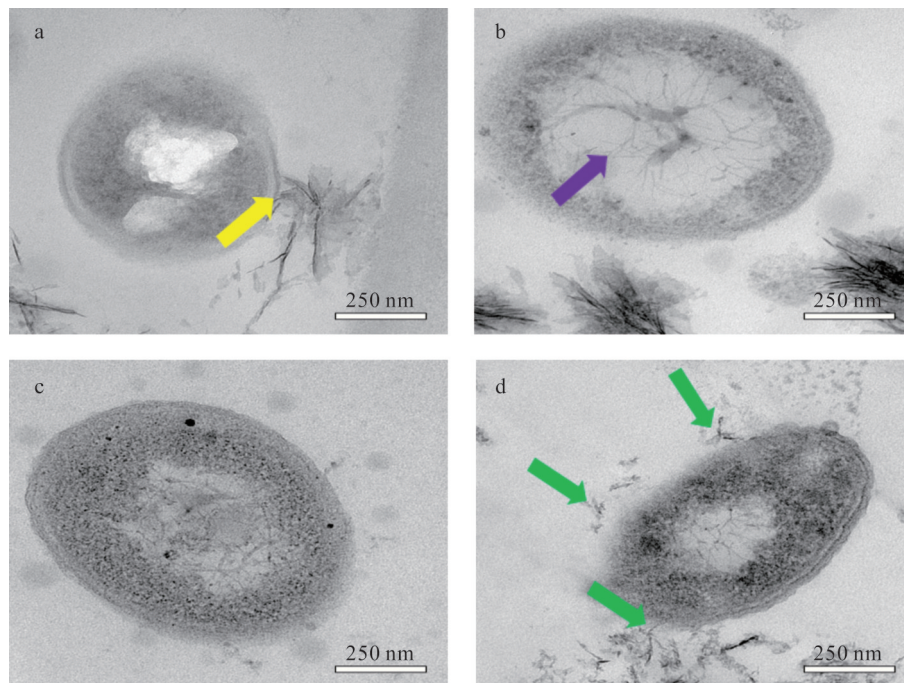


图 12 不同处理方式下接种叶片的苜蓿壳二孢孢子透射电镜

Fig. 12 Transmission electron microscopy (TEM) images of *A. medicaginicola* spores of inoculated leaves under different treatments

a: 先注射 Cu NPs→再注射菌 Inoculation of Cu NPs→reinoculation with fungi; b: 先注射 Cu NPs→再注射菌 Inoculation of Cu NPs→reinoculation with fungi; c: 只接种菌 Fungal inoculation only; d: 先注射菌→再注射 Cu NPs Inoculation of fungi→reinoculation with Cu NPs.

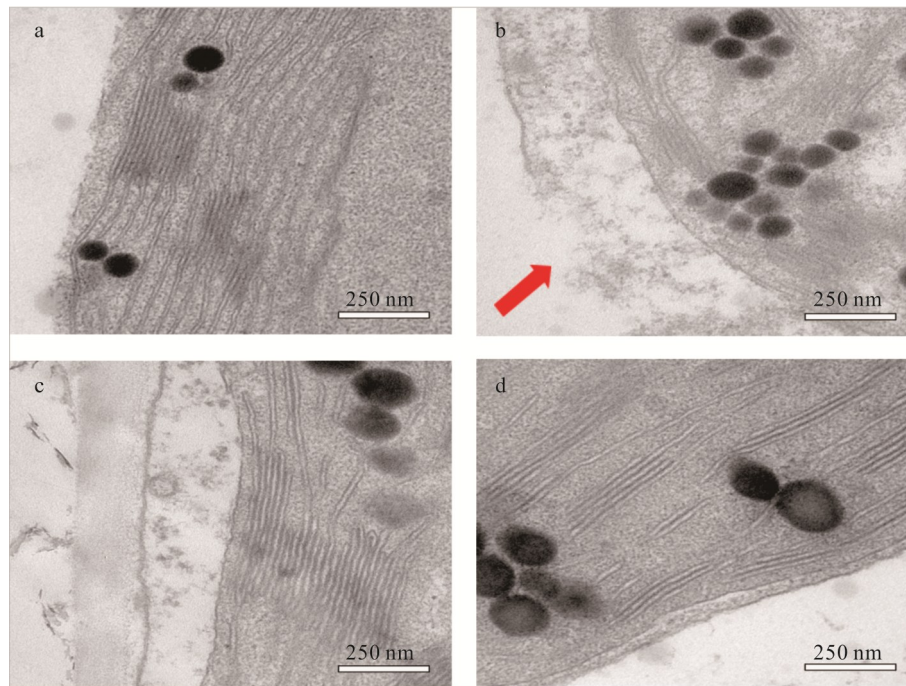


图 13 不同处理方式下接种叶片的叶绿体透射电镜

Fig. 13 Chloroplast transmission electron microscopy (TEM) images of inoculated leaves under different treatments

a: 空白对照 Blank control; b: 只接种菌 Fungal inoculation only; c: 先注射菌→再注射 Cu NPs Inoculation of fungi→reinoculation with Cu NPs; d: 先注射 Cu NPs→再注射菌 Inoculation of Cu NPs→reinoculation with fungi.

经得到广泛验证,如 CuO NPs 可以有效抑制烟草疫霉 (*Phytophthora parasitica*)^[22]等。同时随着 Cu NPs 浓度的升高,抑菌能力显著增加,反映出其毒力与二者相互直接接触密切相关,通过毒力回归方程计算得到抑菌 50% 时的 Cu NPs 浓度为 331 mg·L⁻¹。Fe NPs、核壳 Fe NPs 的菌丝抑制率相较于前两者显著下降,随着接种时间的增加,对菌丝的抑制效果愈发降低。

紫花苜蓿叶片受到苜蓿壳二孢侵染后,出现不规则状黑色或深褐色斑点,边缘带有黄色晕圈,并随侵染时间的增加,黑色斑点增加,黄色晕圈面积增大^[3]。本试验中,只注射孢子悬浮液的叶片病变处发黄且出现黑褐色斑点,相对病斑面积 21.79%,显著高于 ($P < 0.05$) 施加 Cu NPs 的处理。有效反映出 Cu NPs 对于春季黑茎病的抑制效果。试验设置喷洒 Cu NPs 两组处理:一为先喷洒 Cu NPs 探究其苜蓿壳二孢的“预防”效果,二为接种壳二孢后喷洒 Cu NPs 对紫花苜蓿的“治疗”效果。对不同处理的紫花苜蓿叶片测定相对病斑面积和相对电导率,先后接种 Cu NPs 的叶片相对病斑面积分别为 5.95% 和 8.75%,表现为 Cu NPs 的“预防”效果优于“治疗”效果。

植物叶片细胞膜对物质具有选择通透性,当植物受到逆境影响,细胞膜遭到破坏,细胞内电解质外渗,导致细胞浸提液的电导率增大,相对电导率随着植物细胞膜受损程度增大而提高。只接种苜蓿壳二孢孢子悬浮液的情况下,相对电导率达到 82.27%,显著高于使用 Cu NPs 悬浮液处理的相对电导率,细胞膜破损程度升高,纳米处理组的指标显著好于侵染组。两种纳米材料的处理中,先喷洒 400 mg·L⁻¹ Cu NPs 悬浮液,后接菌处理的叶片相对电导率为 18.11%,而接菌后喷洒 Cu NPs 悬浮液的相对电导率为 62.22%,先接种 Cu NPs 的相对电导率显著低于 ($P < 0.05$) 后接种 Cu NPs 的,再次证明 Cu NPs 的“预防”效果更好。

植物抗氧化酶系统中 CAT、SOD、POD 清除植物体内活性氧,SOD 将超氧阴离子歧化为 H₂O₂ 和 O₂,减少细胞损伤,CAT 和 POD 接着将歧化产生的 H₂O₂ 继续分解,避免过量积累的 H₂O₂ 损伤细胞。PPO 起到氧化酚类物质的作用,酶活性的增强有效提高抗病性^[17]。PAL 参与植物体内黄酮类次生代谢物的形成。本研究中,使用的紫花苜蓿品种甘农 1 号对苜蓿壳二孢引致的春季黑茎病呈现高抗性^[2],抗氧化酶活性随着不同的处理方式产生不同的影响^[23]。PPO 和 POD 酶活性在只接菌的处理中相较对照组出现明显下降,与文献[3]中 PPO 酶活性下降的

时间段保持一致。喷施 Cu NPs 处理组 PPO 酶活性急剧上升,达到与空白处理组接近的水平,表明 Cu NPs 可以有效地激活 PPO 酶活性,推测加入的 Cu NPs 可以通过某种途径对该酶的合成产生帮助。带正电荷的纳米 Ag/SiO₂ 复合材料在抑制蚕豆灰霉菌时也可激活 PPO 酶活性^[19]。经过处理的叶片 POD 酶活性均显著下降($P < 0.05$),Cu NPs 对 POD 酶产生途径没有直接关系。CAT、POD 和 SOD 酶活性关系到植物体内活性氧的清除效果。只接菌处理的 CAT、SOD 酶活性显著上升。由于 POD 酶活性在接菌后显著降低且 Cu NPs 对该酶活性无激活效果,易造成植物体内积累过量的 H₂O₂ 损害细胞,Cu NPs 使 SOD 酶活性显著下降,Cu NPs 通过抑制 SOD 酶活性间接减少 H₂O₂ 的产生。CAT 酶活性在先接菌后施加 Cu NPs 处理中相比只接菌处理显著升高,进一步清除 H₂O₂。PAL 酶活性在接种 Cu NPs 后下降,这可能是由于 Cu NPs 对孢子提前包围、聚集,从而未能诱导植物产生 PAL,激发次生代谢物产生途径。

一些纳米材料抗菌活性研究表明,纳米材料通过产生真菌细胞形态的损伤来抑制真菌病害。如 CuO NPs 破坏烟草疫霉的孢子^[13],吸附在孢子周围,使孢子的细胞膜破损、细胞质出现空心液化^[10],使用 ZnO NPs 导致引起咖啡(*Coffea arabica*)叶斑病的柠檬黄色小菇(*Mycena citricolor*)细胞壁变薄以及破坏细胞内营养生殖结构^[24]。在本研究中对叶片进行透射电镜成像,观察超微结构,发现 Cu NPs 处理后壳二孢孢子同样出现破损与空心化的现象,这与文献[13]中报道的情况相一致,且 Cu NPs 与破损真菌孢子接触十分紧密,反映出 Cu NPs 的抑菌方式可能一部分在于其对真菌孢子接触破坏,壳二孢孢子周围的 Cu NPs 团聚体刺穿孢子细胞膜,推测 Cu NPs 对病原孢子的作用机制可能是二者互相直接接触^[25]。纳米颗粒可能与孢子表面的糖蛋白和半乳糖形成复合物,固定在孢子细胞膜上的具有黏附特性的糖蛋白可能在纳米颗粒-孢子界面相互影响的过程中发挥关键作用^[26]。从而进一步破坏孢子的细胞膜,对病害产生抑制作用。

4 结论与展望

本研究首先筛选 4 种纳米材料,发现在 Cu NPs 处理下显著抑制了苜蓿壳二孢的生长,通过菌丝生长抑制试验,得到菌丝生长抑制 50% 时的 EC₅₀ 值,在 400 mg·L⁻¹ 浓度时抑制率达到 74.1%,兼顾抑菌效果与经济适用性。验证了 Cu NPs 对春季黑茎病的“预防”与“治疗”效果,初步判断 Cu NPs 的“预防”效果更为优良,为下一步开发应用纳米农药提供研究基础,但其应用安全性仍需要大量试验评估审核,抑菌的核心机理有待进一步挖掘,但纳米材料的应用潜力已经充分展现。研究为深入了解 Cu NPs 对农业中病害真菌的环境行为,以及开发高效、绿色的纳米杀菌剂对抗植物病原真菌提供思路。

参考文献 References:

- [1] Nan Z B. Alfalfa diseases and integrated disease prevention and control system in China. *Animal Science and Veterinary Medicine*, 2001, 18(4): 81–84.
南志标. 我国的苜蓿病害及其综合防治体系. *动物科学与动物医学*, 2001, 18(4): 81–84.
- [2] Song Y Y. Evaluation of the resistance of forty varieties of alfalfa to stem and leaf fungal diseases. Lanzhou: Lanzhou University, 2016.
宋雨阳. 紫花苜蓿 40 个品种对茎叶真菌病害的抗性评价. 兰州: 兰州大学, 2016.
- [3] Fan Q. Study on pathogenic mechanism of *Phoma medicaginis* on alfalfa. Lanzhou: Lanzhou University, 2019.
樊秦. 苜蓿茎点霉对苜蓿的致病机理研究. 兰州: 兰州大学, 2019.
- [4] Chen C, Wu C. Research progress of green synthesis of nanoparticle and its application in agricultural science. *China Vegetables*, 2022(11): 32–43.
陈城, 吴楚. 纳米颗粒的绿色合成及其在农业上的应用研究进展. *中国蔬菜*, 2022(11): 32–43.
- [5] Sun P B, Wang Z J, Ge G T, et al. Effects of nano-selenium spraying on yield, nutritional quality, and selenium content of alfalfa. *Chinese Journal of Grassland*, 2023, 45(8): 79–87.
孙鹏波, 王志军, 格根图, 等. 喷施纳米硒对紫花苜蓿产量、营养品质和硒含量的影响. *中国草地学报*, 2023, 45(8): 79–87.
- [6] Shenashen M, Derbalah A, Hamza A, et al. Recent trend in controlling root rot disease of tomato caused by *Fusarium solani*

- using alumina silica nanoparticles. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, 2017, 4(6): 105–119.
- [7] Jothirethinam A, Prathiba S, Shanthi N, *et al.* Green synthesized silver nanoparticles prepared from the antimicrobial crude extracts of two brown seaweeds against plant pathogens. *American Journal of Nanotechnology*, 2015, 6(2): 31–39.
- [8] Bonjar G, Aghighi S, Khatami M, *et al.* *In vitro* and *in vivo* antifungal properties of silver nanoparticles against *Rhizoctonia solani*, a common agent of rice sheath blight disease. *IET Nanobiotechnology*, 2017, 11(3): 236–240.
- [9] Kaur P, Thakur R, Duhan S J, *et al.* Management of wilt disease of chickpea *in vivo* by silver nanoparticles biosynthesized by rhizospheric microflora of chickpea (*Cicer arietinum*). *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2018, 93(11): 3233–3243.
- [10] Hyunho K, Wade E, Yu S, *et al.* Silica nanoparticle dissolution rate controls the suppression of *Fusarium* wilt of watermelon (*Citrullus lanatus*). *Environmental Science & Technology*, 2021, 55(20): 13513–13522.
- [11] Barik T, Sahu B, Swain V. Nanosilica-from medicine to pest control. *Parasitology Research*, 2008, 103(2): 253–258.
- [12] Shivanand K I, Ahmad T S, Ahmad N B, *et al.* Copper nanoparticles: Green synthesis and managing fruit rot disease of chilli caused by *Colletotrichum capsici*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2020, 28(2): 1477–1486.
- [13] Chen J N, Wu L T, Song K, *et al.* Nonphytotoxic copper oxide nanoparticles are powerful “nanoweapons” that trigger resistance in tobacco against the soil-borne fungal pathogen *Phytophthora nicotianae*. *Journal of Integrative Agriculture*, 2022, 21(11): 3245–3262.
- [14] Mazhar M W, Ishtiaq M, Hussain I, *et al.* Seed nano-priming with zinc oxide nanoparticles in rice mitigates drought and enhances agronomic profile. *PLoS One*, 2022, 17(3): e0264967.
- [15] Rosa-García S C D, Martínez-Torres P, Gómez-Cornelio S, *et al.* Antifungal activity of ZnO and MgO nanomaterials and their mixtures against *Colletotrichum gloeosporioides* strains from tropical fruit. *Journal of Nanomaterials*, 2018, 2018(1): 1–9.
- [16] Yuan Q H. Advances in alfalfa diseases in China. *Plant Protection*, 2007, 33(1): 6–10.
袁庆华. 我国苜蓿病害研究进展. *植物保护*, 2007, 33(1): 6–10.
- [17] Mohammadi M, Kazemi H. Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. *Plant Science*, 2002, 162(4): 491–498.
- [18] Ashraf H, Anjum T, Riaz S, *et al.* Inhibition mechanism of green-synthesized copper oxide nanoparticles from *Cassia fistula* towards *Fusarium oxysporum* by boosting growth and defense response in tomatoes. *Environmental Science: Nano*, 2021, 8(6): 1729–1748.
- [19] Baka Z A, Zahed M M. Antifungal activity of silver/silicon dioxide nanocomposite on the response of faba bean plants (*Vicia faba* L.) infected by *Botrytis cinerea*. *Bioresources and Bioprocessing*, 2022, 9(1): 102.
- [20] Yan P X, Zhu Y, Wu Z G, *et al.* Elementary substance nano powder material with core-shell structure, preparation method thereof and application thereof in agriculture: 2020110708074, 2021-02-02.
闫鹏勋, 祝英, 吴志国, 等. 具有核壳结构的单质纳米粉体材料及其制备方法和在农业上的应用. 中国专利: 2020110708074, 2021-02-02.
- [21] Jo Y K, Kim B H, Jung G. Antifungal activity of silver ions and nanoparticles on phytopathogenic fungi. *Plant Disease*, 2009, 93(10): 1037–1043.
- [22] Devipriya D, Roopan S M. *Cissus quadrangularis* mediated ecofriendly synthesis of copper oxide nanoparticles and its antifungal studies against *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*. *Materials Science and Engineering*, 2017, 80(12): 38–44.
- [23] Djebali N, Mhadhbi H, Jacquet C, *et al.* Involvement of hydrogen peroxide, peroxidase and superoxide dismutase in response of *Medicago truncatula* lines differing in susceptibility to *Phoma medicaginis* infection. *Journal of Phytopathology*, 2007, 155(10): 633–640.
- [24] Arciniegas-Grijalba P, Patiño-Portela M, Mosquera-Sánchez L, *et al.* ZnO-based nanofungicides: Synthesis, characterization and their effect on the coffee fungi *Mycena citricolor* and *Colletotrichum* sp. *Materials Science & Engineering C*, 2019, 98(5): 808–825.
- [25] Wang H F, Gu L R, Li Y, *et al.* Unique aggregation of anthrax (*Bacillus anthracis*) spores by sugar-coated single-walled carbon nanotubes. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(41): 13364–13365.
- [26] Bamford C V, Nobbs A H, Barbour M E, *et al.* Functional regions of *Candida albicans* hyphal cell wall protein Als3 that determine interaction with the oral bacterium *Streptococcus gordonii*. *Microbiology*, 2015, 161(1): 18–29.