

L-香芹酮对小麦茎基腐病原菌的熏蒸抑菌活性研究

赵筱岑, 尤伟晨, 王春生, 任雯晶, 陈利军

(信阳农林学院农学院, 河南信阳 464000)

摘要: L-香芹酮广泛存在于唇形科、伞形科等草本植物中, 是一种具有挥发性的单萜类化合物, 对常见植物病原菌具有良好的抑菌效果。为进一步明确 L-香芹酮对小麦茎基腐病病原菌的熏蒸抑制效果, 采用菌丝生长速率法测定了 L-香芹酮对小麦茎基腐病 4 种病原菌的熏蒸抑制活性, 观察经 L-香芹酮熏蒸处理后假禾谷镰孢菌(*Fusarium pseudograminearum*) 菌丝侵染能力及形态变化, 探究其抑菌机制。结果表明, L-香芹酮对 4 种供试小麦茎基腐病病原菌均有较强熏蒸抑制作用, 对亚洲镰孢菌(*F. asiaticum*)、平脐蠕孢菌(*Bipolaris sorokiniana*)、假禾谷镰孢菌和层出镰孢菌(*F. proliferatum*) 的 EC_{50} (对供试病原菌达到 50% 抑制率时的药剂浓度) 分别为 2.13、6.12、7.20 和 19.05 $\mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$ 。经 L-香芹酮熏蒸处理后假禾谷镰孢菌丝出现畸形、断裂、原生质泄漏等现象, 胞外相对电导率明显升高, 可达 232.07%; 核酸和蛋白质泄漏增加, 260 和 280 nm 处吸光值分别达到 2.20 和 1.33。PI 染色结果显示, 经 L-香芹酮熏蒸处理后, 假禾谷镰孢菌细胞膜完整性被破坏, 通透性增强。综合来看, L-香芹酮对小麦茎基腐病菌具有良好的抑菌效果。

关键词: 小麦茎基腐病; 假禾谷镰孢菌; L-香芹酮; 熏蒸抑制

中图分类号: S512.1; S432

文献标识码: A

文章编号: 1009-1041(2025)09-1283-10

Fumigate Antifungal Activities of L-Carvone against Wheat Fusarium Crown Rot Pathogens

ZHAO Xiaocen, YOU Weichen, WANG Chunsheng, REN Wenjing, CHEN Lijun

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

Abstract: L-carvone, a volatile monoterpene compound, widely present in herbaceous plants, such as *Labiatae* and *Umbelliferae*, exhibits excellent antifungal effects against common plant pathogens. To further clarify the fumigation antifungal activity of L-carvone on wheat Fusarium crown rot (FCR) pathogens and investigate its inhibitory mechanism, this experiment employed the mycelial growth rate method to determine the fumigation inhibitory activity of L-carvone against four FCR pathogens. The infection ability and morphological changes of *Fusarium pseudograminearum* mycelium after fumigation with L-carvone were observed and analyzed to explore its antifungal mechanism. The results showed that L-carvone exhibited strong fumigation inhibitory effects on all the tested FCR pathogens; the EC_{50} (the concentration of the agent that achieves a 50% inhibition rate against the tested pathogen) for *F. asiaticum*, *Bipolaris sorokiniana*, *F. pseudograminearum*, and *F. proliferatum* were 2.13, 6.12, 7.20, and 19.05 $\mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. After fumigation treatment with L-carvone, the hyphae of *F. pseudocercosporum* exhibited abnormalities, breakage, and leakage of protoplasm, with a significant increase in extracellular relative conductivity, reaching up to 232.07%. Leakage of nucleic acids and proteins increased, with absorbance values at 260 and 280 nm reaching 2.20 and 1.33, re-

收稿日期: 2024-11-13 修回日期: 2025-01-15

基金项目: 河南省自然科学基金项目(232300420030); 河南省高等学校重点科研项目(25B210017); 信阳农林学院作物绿色防控与品质调控科技创新团队项目(XNKJTD-007); 河南省科技攻关项目(242102110089)

第一作者 E-mail: zhaoxc95@163.com(赵筱岑)

通讯作者 E-mail: chlijun1980@163.com(陈利军)

spectively. PI staining results indicated that the cell membrane integrity of *F. pseudocercosporum* was disrupted and permeability was enhanced after fumigation treatment with L-carvone. The study demonstrated that L-carvone had a good control effect on FCR.

Keywords: Fusarium crown rot of wheat; *Fusarium pseudograminearum*; L-carvone; Fumigate antifungal activity

小麦作为重要的粮食作物之一,其品质与产量直接关系到国家粮食安全。近些年,由于气候和耕作制度的改变,小麦茎基腐病(*Fusarium crown rot of wheat*, FCR)呈现不断蔓延与加重的态势,已经成为黄淮等小麦主产区的重要病害之一,严重影响了小麦高产优质生产^[1]。小麦茎基腐病从小麦分蘖期至成熟期均可受害,造成烂种、死苗、成株期茎基部变褐腐烂、白穗等症状。据报道,引起小麦茎基腐的病原菌主要有假禾谷镰孢菌(*Fusarium pseudograminearum*)、禾谷镰孢菌(*F. graminearum*)、层出镰孢菌(*F. proliferatum*)、亚洲镰孢菌(*F. asiaticum*)、平脐蠕孢菌(*Bipolaris sorokiniana*)、黄色镰孢菌(*F. culmorum*)、木贼镰孢菌(*F. equiseti*)、三线镰孢菌(*F. tricinctum*)、根腐离蠕孢菌(*Bipolaris sorokiniana*)等。中国不同地区小麦茎基腐病的优势病原菌在不同的年份间有差异。栾冬冬等^[2]对2008—2019年间中国的小麦茎基腐病原菌进行了分离鉴定,发现2008—2013年黄淮麦区的优势病原菌为根腐离蠕孢、禾谷镰孢菌和亚洲镰孢菌;2013—2019年间优势病原菌为假禾谷镰孢菌和禾谷镰孢菌。甘肃、宁夏、新疆等麦区小麦茎基腐病的优势病原菌也均为假禾谷镰孢菌。2019年,朱运启等^[3]在陕西63个采样点采集分离得到224株小麦茎基腐病原菌,其中假禾谷镰孢菌占比达到了89.73%。李佳琪等^[4]调查表明2023年陕西和山西的小麦茎基腐分离所得病原菌中假禾谷镰孢菌占比84.71%,三线镰孢菌占比8.24%,禾谷镰孢菌占比3.53%。范学锋等^[5-7]对近年来中国不同麦区的茎基腐病原菌种群组成进行了系统的研究,北方冬麦区(河南、河北、山东、山西和陕西)优势病原菌为假禾谷镰孢菌,河套春麦区(内蒙古巴彦淖尔和宁夏地区)优势病原菌为假禾谷镰孢菌和黄色镰孢菌,长江中下游麦区(湖北、安徽和江苏)的优势病原菌为亚洲镰孢菌、禾谷镰孢菌和假禾谷镰孢菌。综合分析可以发现,近年来假禾谷镰孢菌已逐渐上升成为中国北方小麦主产区茎基腐病的优势病原菌。此外,有研究表明,

尽管假禾谷镰孢菌与禾谷镰孢菌均能引起小麦茎基腐病,但是假禾谷镰孢菌的致病力更强^[8-10]。

假禾谷镰孢菌以菌丝体潜伏在种子内、田间土壤和病残体中,存活期长且具有多次侵染的特点,对小麦安全生产构成严重威胁。现阶段对小麦茎基腐病的防治主要采用农业和化学防治相结合的方法,目前已登记的防治小麦茎基腐病的药剂有三氟吡啶胺种子处理悬浮剂、丙硫菌唑·戊唑醇悬浮剂和咯菌·噻虫胺悬浮种衣剂,生产上常用药剂有丙环唑、啞菌酯、戊唑醇等。小麦茎基腐病害的生防制剂暂无登记信息,但近年来小麦茎基腐病的生防资源挖掘逐渐成为研究热点,一些生防微生物如芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)和木霉菌(*Trichoderma* spp.)的发酵液对小麦茎基腐病具有较好的防效^[11],哈茨木霉拌种处理也可以有效降低根际微生物中镰孢菌的丰度,提高小麦出苗率和产量^[12];解淀粉芽孢杆菌(*B. velezensis*) YB-161对假禾谷镰孢菌菌丝生长和孢子萌发有抑制作用^[13];直丝紫链霉菌(*Streptomyces* spp.) YC2-3对小麦茎基腐病的室内盆栽防效可达73.94%^[14]。

除生防微生物外,一些植物精油及其主要成分对植物病原真菌也具有较好的抑制作用,如柠檬醛能完全抑制禾谷镰孢菌的生长,丁香酚能显著抑制禾谷镰孢菌和黄曲霉的生长^[15]。此外,留兰香挥发油对禾谷镰孢菌等病菌具有较强的熏蒸抑制作用,EC₅₀仅为6.71 μL·L⁻¹。L-香芹酮作为留兰香挥发油的主要成分,是一种具有挥发性的单萜化合物,分子式为C₁₀H₁₄O,淡黄色或无色的液体,有清凉而特有的芳香甜味,多应用于果蔬保鲜^[16]。目前,将L-香芹酮应用于小麦病害防治的研究较少,本试验通过测定L-香芹酮对小麦茎基腐病4种病原菌的熏蒸抑菌效果,明确其抑菌活性;观察经L-香芹酮熏蒸处理后假禾谷镰孢菌菌丝侵染能力及形态变化,探究其抑菌机制,为开发以L-香芹酮为主要成分的植物源杀菌剂和小麦茎基腐病的生物防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌株:假禾谷镰孢菌(*F. pseudogrammea-rum*)、层出镰孢菌(*F. proliferatum*)、亚洲镰孢菌(*F. asiaticum*)和平脐蠕孢菌(*B. sorokiniana*);供试小麦品种为豫农 905(Yunong 905),均由信阳农林学院农学院植物病理实验室提供。

试剂:PI 染色试剂盒,上海生物工程股份有限公司;电镜用锞酸、spurr 包埋剂,美国 SPI-CHEM 公司;其余试剂均为国产分析纯。

培养基:马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基和马铃薯葡萄糖(PDB)培养基。

主要仪器:DDSJ-308F 型电导率仪,上海仪电科技;TL3900M 型光学显微镜,上海缔伦光学仪器有限公司;U-T1810D 紫外可见分光光度计,屹普仪器制造(上海)有限公司;TGL-16G 台式离心机,上海安亭科学仪器厂;SU-8010 型扫描电镜和 H-7650 型透射电镜,日本 Hitachi 公司;NE910-FL 荧光显微镜,广州市明慧科技有限公司。

1.2 L-香芹酮对小麦茎基腐病 4 种病原菌的熏蒸抑制作用测定

病原菌的熏蒸抑制作用采用菌丝生长速率法测定^[17]。制备 15 mL PDA 平板培养基,4 种小麦茎基腐病病原菌培养 72 h,在平板的菌落边缘打取直径为 5 mm 的菌饼,接种至 PDA 平板中央,并在皿盖内侧中心放置一张已灭菌的直径为 5 mm 圆形滤纸片,将对应浓度梯度(表 1)的 L-香芹酮滴加在滤纸片上,以仅放置滤纸片作为对照,皿盖皿底对扣并用封口膜密封后,于 25 °C 恒温培养箱中倒置培养,每处理重复 3 次。72 h 后测量菌落直径并计算抑菌率,利用 SPSS 分析得到毒力回归方程($y = ax + b$, y 为菌丝生长抑制率, x 为药剂浓度对数)、 EC_{50} (对供试病原菌达到 50% 抑制率时的药剂浓度)和 EC_{90} (对供试病原菌达到 90% 抑制率时的药剂浓度)。

$$\text{菌丝生长抑制率} = \frac{\text{对照组菌落直径} - \text{处理组菌落直径}}{\text{对照组菌落直径} - \text{菌饼直径}} \times 100\%$$

1.3 L-香芹酮对假禾谷镰孢菌的熏蒸抑菌机制分析

1.3.1 显微结构和超微结构的观察

参考陈利军等^[18]的方法,假禾谷镰孢菌落培养 3 d,在菌落边缘打取菌饼(5 mm)置于 PDA 平板中央,皿盖中心对应位置分别放置滴加了 EC_{50} 和 EC_{90} 剂量 L-香芹酮的滤纸片,以空白滤纸片

为对照。密封后,于 25 °C 恒温培养箱中倒置培养,24 h 后观察菌落形态并在光学显微镜下观察菌落边缘菌丝形态。从菌落边缘切取 PDA 培养基(约 5 mm×5 mm),用 2.5% 戊二醛溶液固定,在 4 °C 恒温箱中过夜处理后,进行扫描电镜和透射电镜制样,观察菌丝形态和细胞结构的变化。

1.3.2 胞外电导率及细胞膜完整性测定

电导率测定参照 Ma 等^[19]的方法。假禾谷镰孢菌培养 72 h,沿菌落边缘打取菌饼,放入 150 mL PDB 液体培养基中,25 °C、180 r·min⁻¹ 恒温振荡培养 3 d 后收集菌丝体,无菌水冲洗 3 次后用布氏漏斗真空抽滤获得菌丝。称取 1 g 菌丝加入装有 100 mL 去离子水的组培瓶里,将分别滴加了 EC_{50} 和 EC_{90} 浓度对应剂量 L-香芹酮的滤纸片放置于瓶盖中心位置,以放置空白滤纸片作为对照,每组 3 次重复,封口膜密封后,置于摇床中继续培养。分别测定药剂处理 0、12、24、36、48、72 h 时的电导率,并计算相对电导率。

$$\text{相对电导率} = \frac{\text{各时间电导率} - 0 \text{ h 电导率}}{0 \text{ h 电导率}} \times 100\%$$

蛋白质和核酸类物质外渗的测定参照王喆等^[20]的方法。步骤同测定电导率,分别取药剂处理 0、12、24、36、48、72 h 时的 4 mL 菌液放入离心机中 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,使用紫外分光光度计测定其上清液在 260 和 280 nm 波长下的吸光度值,分析溶液中菌丝体蛋白质和核酸泄漏情况,每处理重复测定 3 次,取平均值。

通过 PI 染色可以观察假禾谷镰孢菌细胞膜完整性。在培养皿底部加入 10 mL PDA 培养基,制成厚薄均匀的平板,待培养基冷却凝固后铺上一层玻璃纸,假禾谷镰孢菌菌饼放置于玻璃纸中央,25 °C 下倒置培养 36 h 后,在皿盖中央分别放置滴加了 EC_{50} 和 EC_{90} 剂量 L-香芹酮的滤纸片,以仅放置空白滤纸片为对照,每组重复 3 次,继续倒置培养 12 h 后用小药匙刮取玻璃纸上的菌丝,放入 5 mL 离心管中,10×PBS 洗涤 3 次,后加入 5 μL PI 染色液至 95 μL 菌液中,混匀,30 °C 黑暗环境下孵育 20 min 后在荧光显微镜下进行显色观察。

1.3.3 L-香芹酮对假禾谷镰孢菌侵染能力的影响

参照孟家兴^[21]的方法测定 L-香芹酮对假禾谷镰孢侵染小麦能力的影响。将刚进入 4 叶期的长势均一、无病虫害的健康豫农 905 小麦苗洗净,在 10% 次氯酸钠溶液中浸泡 2 min 后用无菌水冲

洗3次,置于超净工作台内吹干备用。用5 mm的打孔器分别打取经浓度为EC₅₀和EC₉₀的L-香芹酮熏蒸处理72 h的菌饼,以不接种菌饼的健康小麦苗作为空白对照,以接种未经处理的假禾谷镰孢菌菌饼作为试验对照,将菌饼正面朝下接种在小麦苗的茎基部并用保鲜膜固定,共计4个处理,每处理接种30株小麦苗,将接种后的小麦苗放入密封盒中并做好保湿,置于25℃培养箱中培养72 h,观察小麦苗患病处发病情况并拍照。

2 结果与分析

2.1 L-香芹酮对小麦茎基腐病4种病原菌菌丝熏蒸抑制结果

根据预试验设置L-香芹酮对4种病原菌的熏蒸抑制剂量梯度,72 h后观察并统计抑菌率,建立毒力回归方程,计算EC₅₀和EC₉₀(表1)。试验结果显示,L-香芹酮对小麦茎基腐病4种病原菌菌丝生长的熏蒸抑制作用随着浓度的增加而逐渐增强。在本试验所采用的直径为90 mm的培养皿空间内,L-香芹酮对亚洲镰孢菌、平脐蠕孢菌

和假禾谷镰孢菌均有较强的抑菌活性,EC₅₀分别为2.13、6.12和7.20 μL·L⁻¹;对层出镰孢菌的抑菌活性稍弱,EC₅₀为19.05 μL·L⁻¹。其中,L-香芹酮对亚洲镰孢菌的抑菌效果最好,抑菌率在浓度为2.67 μL·L⁻¹时即可达到68.52%;对假禾谷镰孢菌和平脐蠕孢菌抑菌效果也较好,在浓度为8 μL·L⁻¹时,抑菌率均达到50%以上,在浓度为20.00 μL·L⁻¹时,对平脐蠕孢菌的抑菌率可达89.74%。

2.2 L-香芹酮对假禾谷镰孢菌抑菌机制的观察与测定

2.2.1 L-香芹酮处理后假禾谷镰孢菌菌丝显微结构和超微结构的观察

在光学显微镜下可以观察到经L-香芹酮熏蒸处理后的假禾谷镰孢菌菌丝形态与对照(CK)组有较大的差异。CK组菌丝表面光滑,形态饱满,纤细直长(图1A、图B);EC₅₀处理组(图1C、图1D)菌丝弯曲畸形,部分菌丝顶端出现球状凸起;EC₉₀组(图1E、图1F)菌丝粗细不均,部分菌丝缠绕扭结在一起并伴有断裂,严重畸变,光学显

表1 L-香芹酮对小麦茎基腐病4种病原菌的熏蒸抑制作用测定结果

Table 1 Determination of L-carvone fumigation inhibition on the four FCR pathogens

小麦茎基腐病病原菌 Pathogen of FCR	浓度 Concentration/ (μL·L ⁻¹)	抑菌率 Inhibition rate/%	毒力回归方程 Toxicity regression equation	R ²	EC ₅₀ / (μL·L ⁻¹)	EC ₉₀ / (μL·L ⁻¹)	95%置信区间 95% confidence interval	
							EC ₅₀	EC ₉₀
假禾谷镰孢菌 <i>F. pseudograminearum</i>	0.67	14.95±0.08						
	1.33	23.88±0.09						
	8.00	53.98±0.05	y=0.85+0.99x	0.99	7.20	144.49	5.47~9.97	71.75~437.00
	10.67	56.31±0.05						
	13.33	58.83±0.03						
层出镰孢菌 <i>F. proliferatum</i>	2.67	7.26±0.02						
	6.67	23.39±0.05						
	13.33	24.73±0.07	y=-2.31+1.81x	0.94	19.05	92.33	11.54~36.93	44.37~785.11
	33.33	70.43±0.06						
	40.00	76.61±0.10						
平脐蠕孢菌 <i>B. sorokiniana</i>	2.67	25.64±0.11						
	6.67	51.65±0.25						
	13.33	69.96±0.09	y=-1.51+1.93x	0.96	6.12	28.71	6.01~8.28	23.00~38.76
	20.00	89.74±0.12						
	26.67	86.81±0.18						
亚洲镰孢菌 <i>F. asiaticum</i>	2.67	68.52±0.03						
	6.67	69.18±0.03						
	13.33	73.28±0.02	y=0.36+0.22x	0.92	2.13	68.15	0.22~4.58	39.48~320.91
	20.00	74.59±0.04						
	26.67	75.41±0.08						

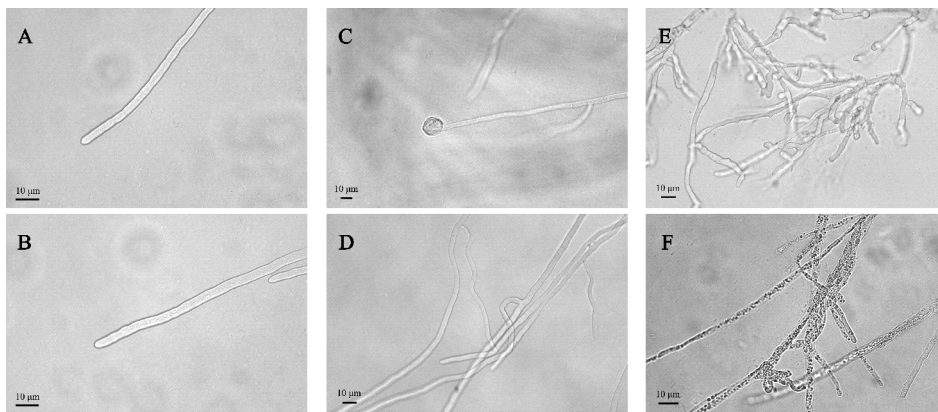
显微镜下可观察到多数菌丝出现原生质分布不均,原生质外泄的现象,表明菌丝细胞膜受损。

扫描电镜观察显示,CK 组菌丝形态正常,表面光滑、菌丝饱满,分隔清晰(图 2A、图 2B);EC₅₀ 处理组菌丝表面粗糙皱缩,菌丝干瘪,扭曲,部分伴有菌丝破裂现象(图 2C、图 2D);EC₉₀ 处理组出现菌丝干瘪、皱缩以及菌丝不完整断裂现象(图 2E、图 2F)。透射电镜观察显示,CK 组(图 3A、图 3B)中假禾谷镰孢菌细胞饱满,内部细胞器完整,形状规则,细胞壁及细胞膜连续完整,细胞质均匀,空腔较少。EC₅₀ 处理组(图 3C、图 3D),细胞器发生溶解现象,细胞内部有空腔增大;EC₉₀ 处理组(图 3E、图 3F)细胞内空腔大量增加,细胞器分解现象明显,胞内原生质整体消解呈碎渣状,细胞壁与细胞膜的间隙变大,细胞膜通透性改变,有胞质渗漏现象。这表明 L-香芹酮不仅改变了

病原菌的细胞膜通透性,同时对细胞内部结构造成了一定程度的破坏。

2.2.2 L-香芹酮对假禾谷镰孢菌细胞膜通透性的影响

相对电导率的变化可以反映细胞膜通透性的变化。在 0~72 h 内,随 L-香芹酮浓度的增大,假禾谷镰孢菌胞外电导率也逐渐增大(图 4)。CK 组假禾谷镰孢菌的胞外电导率随时间变化不明显,曲线较平缓;而 EC₅₀ 和 EC₉₀ 处理组胞外电导率均呈递增的趋势,且在处理 12 h 内相对电导率出现明显升高,处理 72 h 后相对电导率分别高达 124.75% 和 232.07%,显著高于 CK 组(28.79%)。这表明 L-香芹酮熏蒸处理在短时间内即可对假禾谷镰孢的细胞膜造成破坏,改变细胞膜通透性,使胞内的离子大量外流,且破坏程度随处理时间增加而不断升高。



A,B:对照;C,D:EC₅₀;E,F:EC₉₀。图 2、图 3 同。

A, B: CK; C, D: EC₅₀; E, F: EC₉₀. The same in figures 2 and 3.

图 1 L-香芹酮处理后假禾谷镰孢菌菌丝的显微观察

Fig. 1 Microscopic observation of mycelia of *F. pseudograminearum* after treated with L-carvone

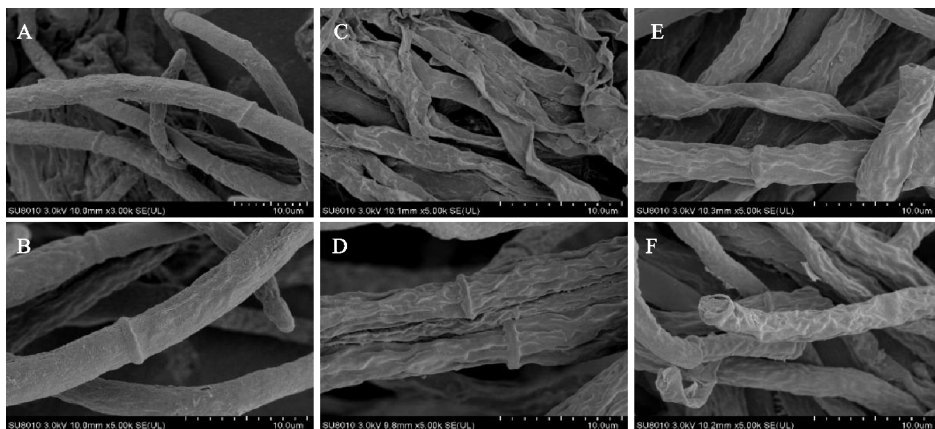


图 2 L-香芹酮处理后假禾谷镰孢菌菌丝的电子显微镜扫描观察

Fig. 2 Electron microscopy observation of mycelia of *F. pseudograminearum* after treated with L-carvone

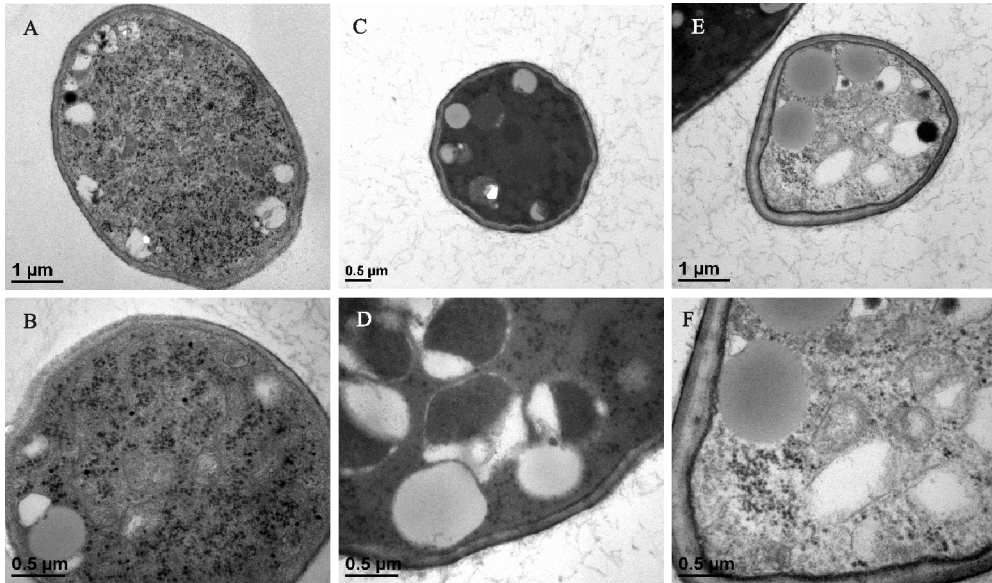
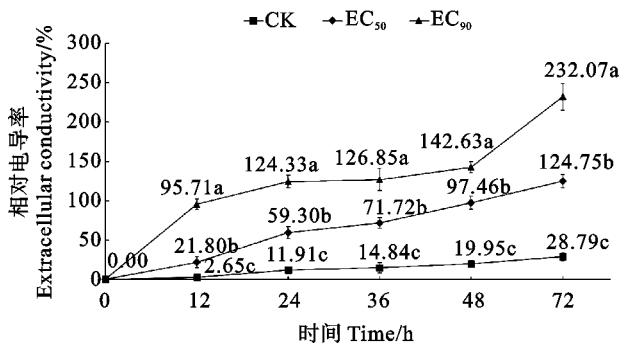


图 3 L-香芹酮处理后假禾谷镰孢菌菌丝的电子显微镜透射观察

Fig. 3 Transmission electron microscopy observation of *F. pseudograminearum* mycelia after treated with L-carvone



CK: 未经处理的菌丝; 不同字母表示同一时间不同处理间在 0.05 水平上差异显著, 图 5、图 6 同。

CK: Untreated mycelia; Different letters at the same time show significant difference at 0.05 level. The same in figures 5 and 6.

图 4 L-香芹酮处理后假禾谷镰孢菌的胞外电导率

Fig. 4 Extracellular conductivity of *F. pseudograminearum* mycelia after treated with L-carvone

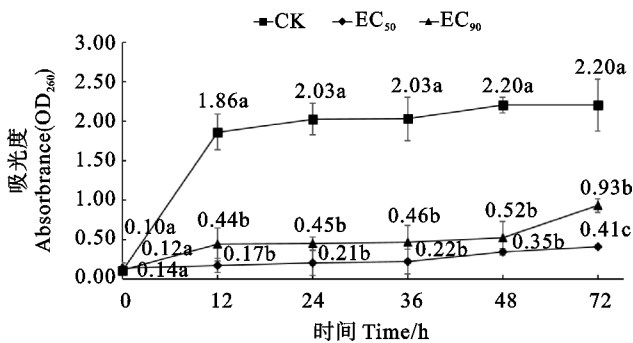


图 5 L-香芹酮处理后假禾谷镰孢菌的细胞核酸泄漏情况

Fig. 5 Nucleic acid leakage of *F. pseudograminearum* cells treated with L-carvone

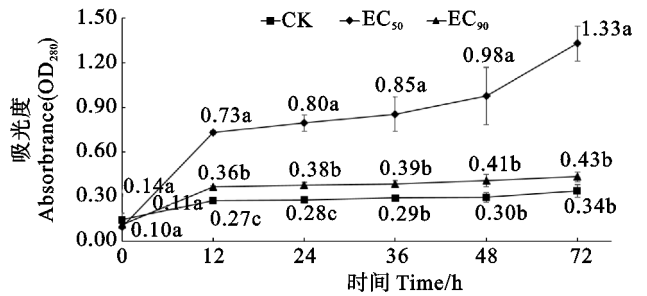


图 6 L-香芹酮处理后假禾谷镰孢菌的细胞蛋白质泄漏情况

Fig. 6 Protein leakage of *F. pseudograminearum* cells treated with L-carvone

2.2.3 L-香芹酮对假禾谷镰孢菌细胞膜完整性的影响

细胞胞外核酸及蛋白质含量的变化反应细胞膜的完整性。本研究分别在 260 和 280 nm 波长处测得假禾谷镰孢菌细胞核酸泄漏(图 5)和蛋白质物质含量(图 6)的变化。图 5 显示,CK 组胞外核酸含量随处理时间变化差异较小,曲线较为平缓,表明未经 L-香芹酮处理的假禾谷镰孢菌细胞膜保持有较高的完整性,EC₅₀ 处理组核酸泄漏较 CK 组有所增加,且随处理时间延长,胞外核酸含量逐渐增加,在 72 h 时增加较快,EC₉₀ 处理组的胞外核酸浓度在 12 h 内快速升高,且从 12 h 后一直显著高于 CK 组和 EC₅₀ 处理组,在 48 h 时吸光值即达到峰值,为 2.20。

从图 6 可以看出,在处理 72 h 内,蛋白质外渗含量结果为 CK 组 < EC₅₀ 处理组 < EC₉₀ 处

理组。同核酸含量测定结果相似,CK 组曲线较平缓,表明其在各个时间胞外蛋白质泄漏含量变化不明显;EC₅₀ 处理组蛋白质泄漏较 CK 组有所增加,但组内在各个时间泄漏含量变化幅度较小;EC₉₀ 处理组蛋白质泄漏自 12h 后一直显著高于 CK 组和 EC₅₀ 组处理,在处理 72 h 的吸光值可达 1.33。这说明随 L-香芹酮浓度与处理时间的增加,细胞破坏作用加剧,蛋白质泄漏量增多。

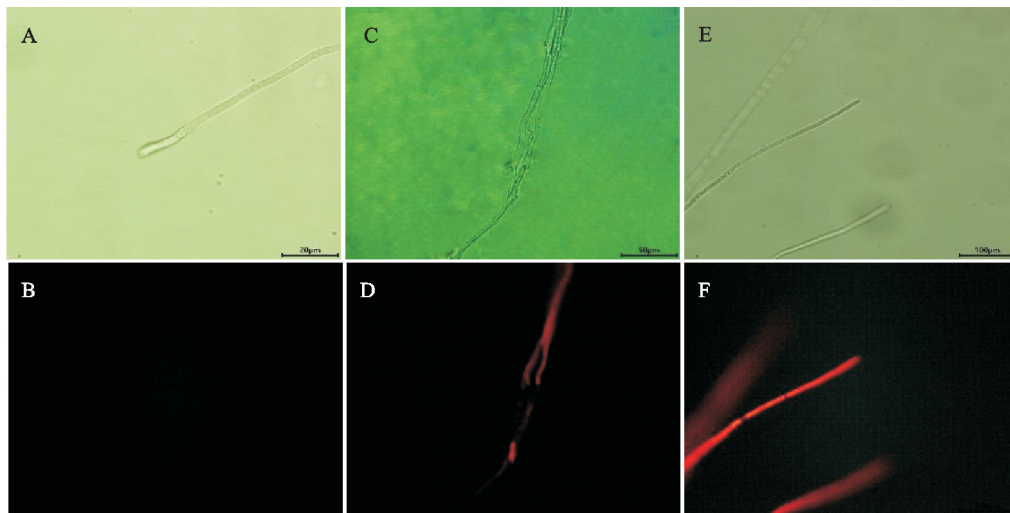
2.2.4 L-香芹酮处理后假禾谷镰孢菌细胞膜完整性的检测

PI 染料无法通过活细胞膜,但可以透过破损细胞膜与 DNA 发生作用,牢固结合并发出红色荧光,通常用于检测细胞受损情况。通过 PI 染色法检测了 L-香芹酮处理前后假禾谷镰孢菌菌丝细胞完整性的变化,CK 组菌丝无荧光出现,表明细胞膜完整性良好(图 7A 和图 7B);EC₅₀ 处理组菌丝体中出现微弱荧光,表明细胞膜有受损现象,细胞膜通透性改变(图 7C 和图 7D);EC₉₀ 处理组菌丝体出现明亮的红色荧光(图 7E 和图 7F),表明细胞膜破损程度进一步加深,几乎被完全破坏。

这表明 L-香芹酮熏蒸处理会破坏假禾谷镰孢菌细胞膜的完整性,且随着 L-香芹酮浓度的增加,细胞膜受损程度加重。

2.3 L-香芹酮对假禾谷镰孢菌侵染小麦能力的影响

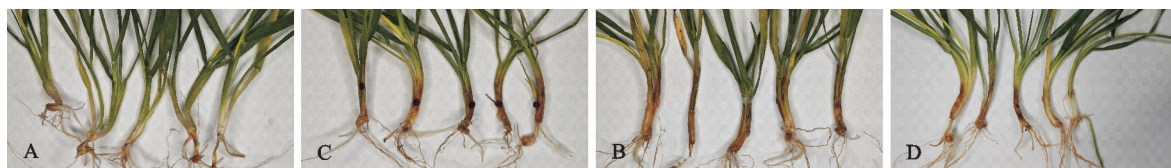
将不同浓度 L-香芹酮熏蒸处理后的假禾谷镰孢菌接种到健康小麦上,观察其侵染能力的变化。如图 8 所示,空白 CK 组的小麦植株茎基部无病斑,颜色正常(图 8A);试验 CK 组的小麦茎基部接种了未经 L-香芹酮熏蒸处理的假禾谷镰孢菌菌饼,茎基部病斑扩展范围较大,茎基部几乎全部变褐,侵染可至叶片基部,且发病部位菌丝生长旺盛,对小麦具有较高的侵染能力(图 8B);EC₅₀ 处理组的菌丝生长较慢,但仍对小麦具有一定的侵染能力,导致茎基部变褐,病斑较对照组小(图 8C);EC₉₀ 处理组的菌丝几乎不生长,且对小麦茎基部的致病力减弱,病斑较小,侵染仅局限在第 1 叶和第 2 叶叶鞘,不再向内扩展(图 8D)。这表明 L-香芹酮熏蒸处理可以降低假禾谷镰孢菌菌丝的侵染能力,且侵染能力随 L-香芹酮浓度的增加而降低。



A, B: CK; C, D: EC₅₀; E, F: EC₉₀。

图 7 L-香芹酮处理后假禾谷镰孢菌细胞膜完整性观察

Fig. 7 Observation on cell membrane integrity of *F. pseudograminearum* after treated with L-carvone



A: 空白 CK; B: 试验 CK(接种菌饼未经处理); C: EC₅₀ 处理组(接种菌饼经 EC₅₀ 剂量 L-香芹酮熏蒸处理); D: EC₉₀ 处理组(接种菌饼经 EC₉₀ 剂量 L-香芹酮熏蒸处理)。

A: Blank CK; B: Experimental CK(untreated inoculated mycelial plugs); C: Treated with EC₅₀ dose(inoculated mycelial plugs treated with EC₅₀ dose L-carvone fumigation); D: Treated with EC₉₀ dose(inoculated mycelial plugs with EC₉₀ dose L-carvone fumigation treatment).

图 8 L-香芹酮对假禾谷镰孢菌侵染小麦的能力影响观察

Fig. 8 Effect of L-carvone on the infection ability of *F. pseudograminearum* on wheat

3 讨论

中国作为世界上最大的小麦生产国,小麦种植面积及产量均居于世界首位。2024年,中国小麦播种面积为 $2.309 \times 10^7 \text{ hm}^2$,产量 1.382×10^8 吨^[22]。近年来,由于气候变化及种植方式、种植结构的调整,小麦茎基腐病在国黄淮麦区有逐年加重的趋势,而针对该产区小麦茎基腐病的优势病原菌假禾谷镰孢菌,目前尚未选育出有效的抗病品种,小麦茎基腐的治理仍以农业措施及化学防治为主^[23-24],但化学农药的长期使用会对环境造成污染,增加病原菌抗药性变异等诸多情况发生。因此,寻找小麦茎基腐绿色防控方法刻不容缓。

植物源杀菌剂具有低毒、高效、环保等优点。周峰等研究发现,香芹酚、厚朴酚、牛至油等8种植物源杀菌剂对假禾谷镰孢菌均有一定的防治效果,其中厚朴酚和香芹酚对假禾谷镰孢菌的 EC_{50} 仅为 4.53 和 $17.55 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[25],防治效果显著。L-香芹酮是留兰香、茼蒿子等植物挥发油中的主要成分,具有安全性高,杀菌活性广泛等优势。Regnier等研究表明L-香芹酮对胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)、可可毛色二孢(*Lasiodiplodia theobromae*)及链格孢(*Alternaria* sp.)等采后病原真菌均有显著的抑制效果^[26]。葛霞等^[27]研究认为,香芹酮处理可以有效降低种薯贮藏期间的失重率和腐烂率,且可以抑制种薯发芽,延缓其生理老化,具有良好的贮藏保鲜效果。这表明L-香芹酮作为植物源杀菌剂对植物病原真菌具有优异的防效,应用于植物病害防控的潜力巨大。小麦茎基腐病原菌主要以菌丝体存活于土壤或病残体中,是一种典型的土传病害,目前中国大部分麦区的推广品种对茎基腐表现感病和高度感病,没有高抗品种,所以控制土壤中的菌源量对茎基腐病的防控具有重要意义。本研究中L-香芹酮对小麦茎基腐病4种病原菌均具有较好的熏蒸抑制作用,其中,对亚洲镰孢菌、平脐蠕孢菌和假禾谷镰孢菌的 EC_{50} 仅为 2.13 、 6.12 和 $7.20 \mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$,表明L-香芹酮可以作为防治小麦茎基腐病的理想的植物源土壤熏蒸剂进行开发。

从植物中提取抑菌活性物质的研究很多,但关于其抑菌机理的报道却相对较少。陈红兵等^[28]发现万寿菊根的乙酸乙酯提取物对西瓜枯萎病菌孢子萌发、菌丝生长无明显影响,但可以通过诱导西瓜幼苗超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶

(POD)活性的提升增强植株抗病性,从而起到了防治病害的作用。Nakamura等^[29]发现,丁香罗勒精油可以通过破坏白假丝酵母细胞壁的完整性,从而降低菌体出芽率。黄芩苷是通过抑制白念珠菌遗传物质如DNA、RNA的生物合成,从而起到抑制作用^[30]。植物源活性物质的抑菌机制复杂多样,且作用于菌体细胞的多个结构^[31]。本研究中,经过L-香芹酮熏蒸处理的假禾谷镰孢菌对小麦的侵染能力变弱,菌丝形态和结构均遭到破坏,细胞膜通透性增加,原生质外渗程度随L-香芹酮处理浓度增加而加重,胞内细胞器结构呈消解状,表明L-香芹酮可能首先作用于细胞膜,破坏其通透性,然后再侵入细胞内部破坏其正常生理功能。

目前以L-香芹酮为基础开发结构更稳定、生物活性更强的衍生化合物也逐渐成为新的研究方向,如蒙玉培、张兆雷等^[32-33]以L-香芹酮为原料分别合成L-香芹酮基磺酸脲酯化合物和L-香芹酮吡啶-脲化合物,这些化合物对黄瓜枯萎病菌(*F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*)、小麦赤霉病菌(*Gibberella zeae*)、水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani* Kühn)具有良好的广谱抗性,其中一些化合物对苹果轮纹病的防效甚至优于百菌清。李凝等^[34]以L-香芹酮为原料合成了6种L-香芹酮硫醚类化合物,部分化合物对水稻稻瘟病菌(*Pyricularia oryzae*)、小麦赤霉病菌、辣椒枯萎病菌(*F. oxysporum*)均具有较好的抑制活性。许奕雯等^[35]制备出L-香芹酮/羟丙基- β -环糊精包合物,不仅提升了香芹酮的水溶性和热稳定性,且对硫色镰孢菌具有明显的抑制效果。本研究中L-香芹酮的抑菌防效试验是在室内离体条件下开展的,田间环境较为复杂,为更好地将L-香芹酮作为植物源杀菌剂应用于小麦茎基腐病的防控,还需进一步的田间防效测定和剂型优化如制备为缓释颗粒、纳米胶囊等,确定其使用时间、使用方法、使用剂量及防治效果,以便更好地指导植物源杀菌剂在对小麦茎基腐病防控中的应用。

参考文献:

- [1] 农业农村部办公厅关于印发《小麦茎基腐病防控技术指导意见》的通知[N]. 中华人民共和国农业农村部公报, 2023, (10):48.
Notice of the General Office of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs on issuing the technical guidance for prevention and control of wheat Fusarium crown rot [N]. *Bulletin of the*

- Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China, 2023, (10):48.
- [2] 栾冬冬, 贾吉玉, 王光州, 等. 中国小麦茎基腐病的发生现状及防治策略[J]. 麦类作物学报, 2022, 42(4):512.
LUAN D D, JIA J Y, WANG G Z, *et al.* Occurrence status and control strategies of wheat crown rot in China [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2022, 42(4):512.
- [3] 朱运启, 靳鹏飞, 王 峭, 等. 陕西省小麦茎基腐病原菌鉴定及其致病力分析[J]. 植物保护学报, 2022, 49(3):824.
ZHU Y Q, JIN P F, WANG Q, *et al.* Species identification and pathogenicity analysis of the pathogens causing wheat crown rot in Shaanxi Province [J]. *Journal of Plant Protection*, 2022, 49(3):824.
- [4] 李佳琪, 王彩叶, 奚柳芸, 等. 陕西省和山西省小麦茎基腐病原菌鉴定及其致病力分析[J]. 麦类作物学报, 2025, 45(4):528.
LI J Q, WANG C Y, XI L Y, *et al.* Species identification and pathogenicity analysis of the pathogen of Fusarium crown rot of wheat in Shaanxi and Shanxi Provinces [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2025, 45(4):528.
- [5] 范学锋. 中国小麦茎基腐病原菌群体组成及遗传结构分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2021.
FAN X F. Population composition and genetic structure analysis of pathogen of *Fusarium* crown rot in China [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2021.
- [6] 王季锋, 王珊珊, 许景升, 等. 黄淮麦区假禾谷镰刀菌对3种杀菌剂敏感性测定[J]. 植物保护, 2023, 49(3):333.
WANG J F, WANG S S, XU J S, *et al.* Sensitivity of *Fusarium pseudograminearum* isolates to three fungicides in Huang-Huai wheat region [J]. *Plant Protection*, 2023, 49(3):333.
- [7] 闫书味, 白尼玛, 潘 鑫, 等. 2022年河南省小麦茎基腐病和赤霉病病原种群分离鉴定[J]. 麦类作物学报, 2024, 44(5):667.
YAN S W, BAI N M, PAN X, *et al.* Separation and identification pathogen populations of *Fusarium* crown rot and *Fusarium* head blight in Henan Province in 2022 [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2024, 44(5):667.
- [8] 赵利民, 冯超红, 蒋 向, 等. 小麦茎基腐病防治技术研究进展[J]. 中国植保导刊, 2022, 42(11):22.
ZHAO L M, FENG C H, JIANG X, *et al.* Research progress on control technology of *Fusarium* crown rot of wheat [J]. *China Plant Protection*, 2022, 42(11):22.
- [9] 李怡文, 李桂香, 黄中乔, 等. 假禾谷镰刀菌引起的小麦茎基腐病发生危害与防控研究进展[J]. 农药学报, 2022, 24(5):949
LI Y W, LI G X, HUANG Z Q, *et al.* Research progress on the occurrence, damage and prevention of *Fusarium* crown rot caused by *Fusarium pseudograminearum* [J]. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2022, 24(5):949.
- [10] CHAKRABORTY S, LIU C J, MITTER V, *et al.* Pathogen population structure and epidemiology are keys to wheat crown rot and *Fusarium* head blight management [J]. *Australasian Plant Pathology*, 2006, 35(6):643.
- [11] 陈 凯, 隋丽娜, 杨 凯, 等. 两株木霉共培养发酵提高对小麦苗期茎基腐病的防治效果[J]. 植物病理学报, 2022, 52(3):425.
CHEN K, SUI L N, YANG K, *et al.* Co-culturation of two *Trichoderma* strains enhanced control efficiency against wheat crown rot at seedling stage [J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2022, 52(3):425.
- [12] 扈进冬, 杨在东, 吴远征, 等. 哈茨木霉拌种对冬小麦生长、土传病害及根际真菌群落的影响[J]. 植物保护, 2021, 47(5):35.
HU J D, YANG Z D, WU Y Z, *et al.* Effects of seed dressing treatment with *Trichoderma harzianum* on the growth of winter wheat seedlings, soil borne diseases and rhizosphere fungal community [J]. *Plant Protection*, 2021, 47(5):35.
- [13] 林琪童, 杨丽荣, 夏明聪, 等. 小麦茎基腐病生防菌株 YB-161 的分离鉴定及防效测定[J]. 植物保护学报, 2020, 47(4):939.
LIN Q T, YANG L R, XIA M C, *et al.* Isolation, identification and control efficiency of biocontrol strain YB-161 against wheat crown rot [J]. *Journal of Plant Protection*, 2020, 47(4):939.
- [14] 陈 婧, 王彤彤, 马 青, 等. 生防链霉菌 YC2-3 的筛选、鉴定及其对小麦茎基腐病的防治效果[J]. 植物病理学报, 2023, 53(3):473.
CHEN J, WANG T T, MA Q, *et al.* Screening, identification and detection of biocontrol effect of strain YC2-3 on wheat crown rot [J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2023, 53(3):473.
- [15] 袁 媛, 邢福国, 刘 阳. 植物精油抑制真菌生长及毒素积累的研究[J]. 核农学报, 2013, 27(8):1168.
YUAN Y, XING F G, LIU Y. Role of essential oils in the inhibition of fungal growth and mycotoxin accumulation [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2013, 27(8):1168.
- [16] 陈利军, 智亚楠, 陈思宇, 等. 留兰香挥发油熏蒸抑菌活性研究[J]. 植物保护, 2019, 45(2):75.
CHEN L J, ZHI Y N, CHEN S Y, *et al.* *Fumigant* antifungal activities of essential oils from *Mentha spicata* [J]. *Plant Protection*, 2019, 45(2):75.
- [17] 赵筱岑, 余鸿飞, 李婷婷, 等. 莽苳挥发油化学组分分析及抑菌活性探究[J]. 信阳农林学院学报, 2022, 32(4):99.
ZHAO X C, YU H F, LI T T, *et al.* The chemical components and antifungal activity of essential oil from *Mosla grosseserrata* [J]. *Journal of Xinyang Agriculture and Forestry University*, 2022, 32(4):99.
- [18] 陈利军, 智亚楠, 王春生, 等. 土荆芥挥发油对灰葡萄孢熏蒸抑制的机理分析[J]. 植物保护学报, 2020, 47(5):1167.
CHEN L J, ZHI Y N, WANG C S, *et al.* Analysis of the fumigation inhibition mechanism of essential oil from *Chenopodium ambrosioides* against the *Botrytis cinerea* [J]. *Journal of Plant Protection*, 2020, 47(5):1167.
- [19] MA M M, WEN X F, XIE Y T, *et al.* Antifungal activity and mechanism of monocaprin against food spoilage fungi [J].

- Food Control*, 2018, 84: 561.
- [20]王 喆, 赵晨宇, 蒋圆婷, 等. 桂枝挥发油杀菌活性及抑菌机制研究[J]. 食品科技, 2019, 44(11): 251.
WANG Z, ZHAO C Y, JIANG Y T, *et al.* Study on the bactericidal activity and antibacterial mechanism of volatile oil from *Rimulus cinnamon* [J]. *Food Science and Technology*, 2019, 44(11): 251.
- [21]孟家兴. 假禾谷镰孢 PY20-1 和 AY20-17 菌株弱致病力机制的探究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2023: 17.
MENG J X. Exploration of the weak pathogenicity mechanism of *Pseudograminearum* PY20-1 and AY20-17 strains [D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2023: 17.
- [22]国家统计局. 国家统计局关于 2024 年夏粮产量数据的公告 [N]. 中国信息报, 2024-07-15(001).
National Bureau of Statistics. Announcement by the National Bureau of Statistics on the 2024 summer grain production data [N]. *China Information News*, 2024-07-15(001).
- [23]谢 伟, 严 雳, 田海月, 等. 我国小麦茎基腐病菌致病力比较分析[J]. 植物保护, 2023, 49(3): 278.
XIE W, YAN L, TIAN H Y, *et al.* Comparative analysis on pathogenicity of *Fusarium* crown rot of wheat in China [J]. *Plant Protection*, 2023, 49(3): 278.
- [24]XU F, YANG G Q, WANG J M, *et al.* Spatial distribution of root and crown rot fungi associated with winter wheat in the North China Plain and its relationship with climate variables [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1054.
- [25]周 锋, 罗奥迪, 韩奥辉, 等. 8 种植物源杀菌剂对假禾谷镰孢菌的抑菌活性及对小麦茎基腐病的防效探究[J]. 麦类作物学报, 2023, 43(12): 1629.
ZHOU F, LUO A D, HAN A H, *et al.* Study on the antibacterial activity of eight botanical fungicides against *Fusarium pseudograminearum* and control effects on *Fusarium* crown rot of wheat [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2023, 43(12): 1629.
- [26]REGNIER T, COMBRINCK S, DU PLOOY W, *et al.* Evaluation of *Lippia scaberrima* essential oil and some pure terpenoid constituents as postharvest mycobiocides for avocado fruit [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2010, 57(3): 176.
- [27]葛 霞, 李守强, 田甲春, 等. 植物源香芹酮对青薯 9 号原种的贮藏效果评价[J]. 保鲜与加工, 2021, 21(5): 1.
GE X, LI S Q, TIAN J C, *et al.* Storage effects evaluation of plant-derived carvone on Qingshu 9 seed potatoes [J]. *Storage and Process*, 2021, 21(5): 1.
- [28]陈红兵, 王金胜, 张作刚, 等. 万寿菊根的提取物对西瓜枯萎病反应的抗性研究[J]. 植物病理学报, 2003, 33(5): 439.
CHEN H B, WANG J S, ZHANG Z G, *et al.* Effects of extract from root of *Tagetes patula* on watermelon resistance against *Fusarium* wilt disease [J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2003, 33(5): 439.
- [29]NAKAMURA C V, ISHIDA K, FACCIN L C, *et al.* *In vitro* activity of essential oil from *Ocimum gratissimum* L. against four *Candida* species [J]. *Research in Microbiology*, 2004, 155(7): 579.
- [30]熊 英, 傅颖媛, 况南珍, 等. 黄芩苷抗白念珠菌作用及机制研究[J]. 中国药理学通报, 2004(12): 1404.
XIONG Y, FU Y Y, KUANG N Z, *et al.* Study on activity and mechanism of baicalin against *Candida albicans* [J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2004(12): 1404.
- [31]李晓菲, 徐 政. 植物源杀菌剂研究进展[J]. 南方农业, 2018, 12(13): 40.
LI X F, XU Z. The research progress on botanical fungicides [J]. *South China Agriculture*, 2018, 12(13): 40.
- [32]蒙玉培, 段文贵, 林桂汕, 等. L-香芹酮基磺酰胺化合物的合成及其抑菌活性[J]. 林产化学与工业, 2024, 44(1): 41.
MENG Y P, DUAN W G, LIN G S, *et al.* Synthesis and antifungal activity of L-carvone-derived oxime sulfonate compounds [J]. *Chemistry and Industry of Forest Products*, 2024, 44(1): 41.
- [33]张兆雷, 段文贵, 马献力, 等. L-香芹酮基吡唑-脲化合物的合成及其植物病原菌抑制活性研究[J]. 林产化学与工业, 2025, 45(1): 89.
ZHANG Z L, DUAN W G, MA X L, *et al.* Synthesis of L-carvone-derived pyrazole-urea compounds and their antifungal activity against plant pathogens [J]. *Chemistry and Industry of Forest Products*, 2025, 45(1): 89.
- [34]李 凝, 王富军, 李 明. L-香芹酮磺酰类化合物的合成及其对三种植物病原真菌的活性研究[J]. 山地农业生物学报, 2010, 29(4): 330.
LI N, WANG F J, LI M. The chemical modification of L (-)-carvone and its biological activity to three fungal pathogens of plant [J]. *Journal of Mountain Agriculture and Biology*, 2010, 29(4): 330.
- [35]许奕雯, 徐 瑞, 田甲春, 等. 香芹酮/羟丙基- β -环糊精包合物的制备、表征及对硫色镰孢菌的抑制作用[J]. 核农学报, 2023, 37(6): 1166.
XU Y W, XU R, TIAN J C, *et al.* Preparation and characterization of carvone/hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex and its inhibitory effect on *Fusarium sulfonum* [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2023, 37(6): 1166.