

禾谷镰刀菌-玉米互作根系分泌物组分的鉴定及其抑菌活性分析

王 云 江 林 杨 倩 谢珊珊*

(安徽农业大学生命科学学院, 作物抗逆育种与减灾国家地方联合工程实验室, 合肥 230036)

摘要: 为明确禾谷镰刀菌 *Fusarium graminearum* 侵染对玉米根系分泌物的影响, 利用液相色谱-质谱 (liquid chromatograph-mass spectrometer, LC-MS) 联用技术和非靶向代谢组学分析手段鉴定侵染样品中的差异组分, 并对差异组分的抑菌效果进行分析。结果表明, 禾谷镰刀菌侵染后, 玉米根系分泌物中共有 34 种组分发生差异表达, 主要包括有机杂环化合物、苯类和有机氧化合物等, 其中尼氟酸、咖啡酸乙酯、4-甲基-3-硝基苯甲酸和乙酸香兰素酯这 4 种组分对禾谷镰刀菌具有明显的抑制效果, 以尼氟酸的抑菌效果最好, 浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 时其对禾谷镰刀菌产孢量和 3 h 孢子萌发的抑制率分别达到 96.0% 和 87.0%。此外, 乙酸香兰素酯能使禾谷镰刀菌菌丝产生大量活性氧; 而尼氟酸和 4-甲基-3-硝基苯甲酸不仅诱导禾谷镰刀菌孢子产生大量活性氧, 还引起菌丝和孢子的细胞坏死。表明筛选出的这 4 种抑菌组分可作为防治玉米茎基腐病的潜在资源。

关键词: 禾谷镰刀菌; 玉米; 根系分泌物; 代谢组学; 抑菌组分; 尼氟酸

Identification of root exudate components during the *Fusarium graminearum*-maize interaction and their antifungal activity

Wang Yun Jiang Lin Yang Qian Xie Shanshan*

(National and Local Joint Engineering Laboratory of Crop Stress Tolerance Breeding and Disaster Reduction, College of Life Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, Anhui Province, China)

Abstract: In order to clarify the effects of fungal pathogen *Fusarium graminearum* infection on the root exudates of maize, liquid chromatography-mass spectrometer (LC-MS) technology and non-targeted metabolomics were used to identify the differential components. The antifungal effects of these differential components were further analyzed. The results showed that a total of 34 root exudate components were differentially expressed in response to *F. graminearum* infection, mainly including organic heterocyclic compounds, benzene and organic oxygen compounds. Among them, four components containing niflunic acid, ethyl caffeate, 4-methyl-3-nitrobenzoic acid and vanillin acetate, exhibited significant inhibitory effects on *F. graminearum*. The niflunic acid exerted the strongest antifungal activity against *F. graminearum*. The inhibitory rate of 100 $\mu\text{g/mL}$ niflunic acid on spore production and spore germination reached 96.0% and 87.0%, respectively. In addition, vanillin acetate treatment caused reactive oxygen species (ROS) accumulation in the mycelium of *F. graminearum*; niflunic acid and 4-methyl-3-nitrobenzoic acid treatments not only induced ROS accumulation in the spores of *F. graminearum*, but also caused cell death of mycelium and spores. Taken together, the four components have the potential to control maize stem rot.

Key words: *Fusarium graminearum*; maize; root exudate; metabolomics; antifungal component; nifluric acid

玉米茎基腐病又称玉米青枯病,在玉米整个生育期均能发生,是一种常见的土传性真菌病害,主要危害茎部和根部,被侵染植株的茎基部初期产生褐色病斑,随后患病部位出现缢缩变软症状,后期茎内部中空松散,最终造成植物萎蔫死亡(Zhang et al., 2016)。近年来,玉米茎基腐病在我国发生较重,严重地块发病率达80%~90%,造成严重减产(肖荣凤等,2017)。引起玉米茎基腐病的病原菌主要包括镰刀菌 *Fusarium* spp. 和腐霉菌 *Pythium* spp., 其中禾谷镰刀菌 *F. graminearum* 是引起玉米茎基腐病的主要致病菌(秦子惠等,2014)。

植物的种子和根可分泌多种物质,具有生物活性的次生代谢产物在调节种子和根际微生物种群及数量、植物养分吸收、减轻植物病害等方面具有重要作用(Surender Reddy et al., 2015; 宋光梅等, 2019; 毛梦雪和朱峰等, 2021)。刘芳芳等(2018)通过研究人参 *Panax ginseng* 茎叶总皂苷处理下腐皮镰刀菌 *F. solani* 的菌丝生长及孢子萌发情况和培养液电导率及菌体过氧化氢酶活性变化,证实人参根系分泌物中的总皂苷能抑制根腐病病原菌腐皮镰刀菌的生长。高雪峰(2017)通过沙培、水培方式收集了短花针茅 *Stipa breviflora*、冷蒿 *Artemisia frigida* 和无芒隐子草 *Cleistogenes songorica* 的根系分泌物,再利用气相色谱-质谱联用仪对这3种植物根系分泌物的组分进行鉴定,并采用化学试剂模拟其根系分泌物中的3种共有组分对土壤中细菌和真菌的多样性、群落组成以及土壤主要性状的影响,发现根系分泌物中的主要成分乙酰柠檬酸三丁酯、1,2-二甲苯和芥酸酰胺均能使真菌多样性下降。

目前,关于玉米茎基腐病的防治以化学药剂为主,但化学药剂的连年施用已使病原菌产生了耐药性。而多种植物根系分泌物已被证实对病原菌具有较好的抑制效果(丁娜等,2022; 杜佳阳,2022; Li et al., 2022)。因此,本研究利用非靶向代谢组学技术对禾谷镰刀菌侵染和未侵染的玉米根系分泌物进行分析,并测定其差异组分对禾谷镰刀菌菌丝生长、产孢量、孢子萌发、活性氧积累及细胞活性的影响,以期防治玉米茎基腐病提供潜在的新物质。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株与植物:禾谷镰刀菌由安徽省农业科

学院植物保护与农产品质量安全研究所保存并提供。玉米品种为B73,由安徽农业大学作物抗逆育种与减灾国家地方联合工程实验室提供。选取饱满健康的种子,用70%乙醇表面消毒1 min,灭菌水洗涤3次,晾干后播种在无菌土中,置于25℃、光照16 h/黑暗8 h条件下生长12~14 d供试。

供试培养基:马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基成分为去皮马铃薯200 g(煮沸30 min后取滤液)、葡萄糖20 g、琼脂15 g,蒸馏水定容至1 L;合成低营养琼脂(synthetic low nutrient agar, SNA)液体培养基成分为KNO₃ 1 g、KH₂PO₄ 1 g、MgSO₄·7H₂O 0.5 g、KCl 0.5 g、葡萄糖0.2 g、蔗糖0.2 g、NaOH 0.024 g,蒸馏水定容至1 L;绿豆汤培养基成分为绿豆煮沸过滤液40 g,蒸馏水定容至1 L;水琼脂(water agar, WA)培养基为0.5%~0.8%琼脂加蒸馏水定容至1 L。

试剂和仪器:二乙酸荧光素(fluorescein diacetate, FAD)、碘化丙啉(propidium iodide, PI),美国Sigma公司;活性氧检测试剂盒,上海碧云天生物技术股份有限公司;其余试剂均为国产分析纯。1290高效液相色谱仪,美国安捷伦科技有限公司;ACQUITY UPLC T3色谱柱(长100 mm×直径2.1 mm,填充物粒径1.8 μm),美国沃特世有限公司;Triple TOF 5600+质谱仪,美国AB SCIEX公司;LSM880激光共聚焦显微镜、DM5000B正置荧光显微镜,德国徕卡公司;GZX-400E光照培养箱,浙江明德微电子股份有限公司;5425小型高速离心机,德国Eppendorf公司。

1.2 方法

1.2.1 根系分泌物收集和代谢组检测

将禾谷镰刀菌接种至PDA平板上进行活化,于25℃黑暗培养5~7 d后,用打孔器从菌落边缘打取直径约7 mm的菌碟,取4~6个菌碟置于绿豆汤培养基中,于28℃、200 r/min条件下摇培2~3 d,用2层纱布进行过滤,将滤液以6 000 r/min离心10 min,弃上清液,沉淀用无菌水清洗2次,再用无菌水调整孢子液浓度至10⁶个/mL,并加入吐温-20至终浓度为0.001%,制成禾谷镰刀菌孢子悬浮液。选取生长约14 d的玉米幼苗,用注射器在玉米茎基部刺出1~2 mm深的伤口,在伤口处注射20 μL禾谷镰刀菌孢子悬浮液,以注射等量无菌水处理作为对照。保湿

培养3 d后,取出整株玉米,用无菌水冲洗玉米根部,直至将土壤冲洗干净后置于无菌水中,于4℃放置24 h,过滤去除玉米根部杂质,将收集的根系分泌物分装于50 mL离心管中,每管约30 mL,放入-20℃冰箱预冻1晚后转移至冷冻干燥机,冷冻干燥3~5 d制成冻干粉,再转移到2 mL灭菌离心管中于-20℃保存备用(Lombardi et al., 2018; Xiong et al., 2020)。禾谷镰刀菌侵染和未侵染的玉米根系分泌物各收集6个批次,将收集的样品在冰上解冻,向样品中加入1 mL预冷的甲醇-乙腈-水溶液(体积比为2:2:1),涡旋混匀,低温超声30 min, -20℃静置10 min,在4℃下以14 000 g离心20 min,取上清液进行真空干燥,质谱分析时加入100 μ L乙腈水溶液(乙腈与水体积比为1:1)复溶,涡旋,在4℃下以14 000 g离心15 min,取上清液采用液相色谱-质谱联用仪进行非靶向代谢组分析,委托杭州联川生物技术股份有限公司完成。

液相色谱条件:柱温为35℃,流速为0.4 mL/min。采用的流动相中A相为水(含0.1%甲酸),B相为乙腈(含0.1%甲酸),梯度设置为:5% B, 0~0.5 min; 5%~100% B, 0.5~7.0 min; 100% B, 7.0~8.0 min; 100%~5% B, 8.0~8.1 min; 5% B, 8.1~10.0 min。质谱检测条件:每个样本分别进行1次正离子模式采集和1次负离子模式采集,离子源的遮蔽气压为30 PSI,气体1(辅气)和气体2(鞘气)压力均设置为60 PSI,离子源温度为650℃,正离子模式时电压为5 000 V,负离子模式时电压为-4 500 V。采集数据的模式为数据依赖采集(information dependent acquisition, IDA)模式,在一个采集循环中,一级采集范围为60~1 200 Da,一级采集时间为150 ms,然后从一级图谱中挑选带1个正电荷(负离子模式下为带1个负电荷)并且每秒信号积累强度超过100的前12个信号离子进行二级碎裂扫描,整个采集循环耗时0.56 s。质谱仪检测器有4个通道,脉冲射频电的频率为11 kHz,检测器的检测频率为40 GHz,每个通道每次扫描的粒子信号单独记录,将4次记录合并后转化成数据。扫描的动态排除时间设置为4 s。在采集过程中,每间隔20个样本进行一次仪器准确度校正,同时每间隔10个样本进行一次质控样品扫描,用质控样本间的质量差距来校正整批试验样品的系统误差。

利用Proteowizard的MSConvert软件将质谱数据原始数据转换成可读数据格式mzXML;利用XCMS软件进行峰提取并进行质控,对提取到的物

质利用CAMERA软件进行加和离子注释;利用metaX软件结合京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)数据库对一级质谱信息进行匹配鉴定,二级质谱信息与in-house标准品数据库进行匹配鉴定,最终得到可信度高的代谢物鉴定结果;利用KEGG数据库对鉴定到的代谢物进行注释,解释代谢物的物理化学性质以及生物功能。

1.2.2 代谢物定量和差异代谢物筛选

利用XCMS软件对1.2.1鉴定到的每种物质在不同样品中的信号强度信息进行提取,并使用metaX软件进行质控:首先去除低质量峰(质量控制样本中缺失超过50%,或者实际样本中缺失超过80%),随后利用K-近邻(K-nearest neighbor, KNN)算法填充缺失值,再采用概率熵归一法(probabilistic quotient normalization, PQN)和质量控制-鲁棒样条校正(QC-robust spline batch correction, QC-RSC)法进行数据归一化,对每种物质进行定量。

采用单变量分析差异倍数(fold-change, FC),应用t检验法得到P值,结合偏最小二乘判别分析(partial least squares discrimination analysis, PLS-DA)得到的变量差异贡献度(variable important for the projection, VIP),筛选差异表达的代谢物。以同时满足 $FC \geq 2$ 或 $FC \leq 1/2$ 以及 $P \leq 0.05$ 和 $VIP \geq 1$ 作为标准,获得差异表达的代谢物。

1.2.3 差异组分对禾谷镰刀菌菌丝生长的影响测定

基于1.2.2鉴定到的上调表达差异代谢物组分,以相应化学纯标准品进行模拟试验,采用菌丝生长速率法测定差异代谢物对禾谷镰刀菌菌丝生长的抑制活性。将PDA培养基于121℃下高压灭菌20 min,在培养皿中分别加入不同质量浓度的22种标准品和PDA培养基充分混匀,使每种组分的终浓度分别为0(对照组)、50、75、100和250 μ g/mL(含1%二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO))。取直径约7 mm的禾谷镰刀菌菌碟,分别转接到添加有不同浓度组分的PDA平板中央,每皿接1个菌碟,于25℃恒温黑暗培养。根据禾谷镰刀菌菌丝生长情况,从培养的第2天开始采用十字交叉法测量菌落直径并记录数据,计算抑制率。每个浓度处理3次重复。抑制率=(对照组菌落直径-处理组菌落直径)/(对照组菌落直径-菌碟直径) $\times 100\%$ (肖媛等, 2020)。

1.2.4 抑菌组分对禾谷镰刀菌产孢量的影响测定

采用血球计数法测定1.2.3筛选到的抑菌组分对禾谷镰刀菌产孢量的影响。在含1% DMSO的绿

豆汤培养基中分别加入各处理组分,使每种组分的终浓度为0(对照)、50和100 $\mu\text{g/mL}$ 。取6个直径约7 mm的禾谷镰刀菌菌碟,转接至上述绿豆汤培养基中,于25 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min条件下培养3~5 d诱导产生分生孢子。用双层无菌纱布收集分生孢子,于25 $^{\circ}\text{C}$ 、6 000 r/min条件下离心10 min,弃上清液,用1 mL无菌水重新悬浮分生孢子,用血球计数板进行计数,统计各处理的产孢量。每个浓度处理3次重复。

1.2.5 抑菌组分对禾谷镰刀菌孢子萌发的影响测定

取1.2.1制备的禾谷镰刀菌孢子悬浮液1 mL,分别加入不同抑菌组分,使其终浓度均为100 $\mu\text{g/mL}$,将其混匀并置于2 mL离心管中,在28 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱放置1 d(中间隔段时间摇匀1次),之后吸取10 μL 菌液于0.5%~0.8% WA平板上涂布均匀,于28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温黑暗培养3、6和12 h后统计孢子萌发情况,计算不同时间段的孢子萌发率(宁胜,2013;李汶玥等,2022)。以芽管长度超过孢子长度的一半作为孢子萌发的标准,每个处理调查100个孢子,重复3次。孢子萌发抑制率=(对照孢子萌发数-处理孢子萌发数)/对照孢子萌发数 $\times 100\%$ 。

1.2.6 抑菌组分对禾谷镰刀菌活性氧积累的影响测定

利用2,7-二氯荧光素二乙酸酯(2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA)探针法对禾谷镰刀菌细胞内活性氧的积累情况进行检测。取直径约7 mm的禾谷镰刀菌菌碟4~6个置于20 mL绿豆汤培养基中,于25 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min条件下摇培12 h,用2~3层干净纱布过滤,用刀片轻刮纱布上的菌丝于2 mL离心管中,加入0.85% NaCl缓冲液1 mL,并分别加入抑菌组分使其终浓度均为100 $\mu\text{g/mL}$ 。以1% DMSO溶液处理作为对照。每个处理3次重复。于25 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min条件下培养6 h,再以8 000 r/min离心5 min,弃去上清液,将沉淀用0.85% NaCl清洗3次,加入1 mL 0.85% NaCl缓冲液,获得处理菌丝。

同时,取4~6个新鲜菌碟置于20 mL SNA液体培养基中,于25 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min条件下摇培3~5 d使禾谷镰刀菌充分产孢,之后用2~3层干净纱布过滤,将过滤液以6 000 r/min离心10 min,弃去上清液,用无菌水调整孢子悬浮液浓度至 10^6 个/mL。取500 μL 孢子悬浮液于2 mL离心管中,并加入500 μL 0.85% NaCl缓冲液,分别加入不同抑菌组分使其终浓度均为100 $\mu\text{g/mL}$ 。以1% DMSO溶液处理作为对照。每个处理3次重复,于25 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min培养6 h,再以8 000 r/min离心5 min,弃去上清液,将沉淀用0.85% NaCl清洗3次,加入0.85% NaCl缓冲液1 mL,

获得处理孢子液。

分别在上述处理好的菌丝和孢子液中加入0.001 $\mu\text{g/mL}$ DCFH-DA,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育30 min,每隔5 min摇匀1次,使试剂与细胞充分接触。使用0.85% NaCl反复吹打后,以8 000 r/min离心5 min,弃去上清液。将沉淀用0.85% NaCl洗涤2~3次,以充分去除未进入细胞内的DCFH-DA。用镊子取出菌丝置于载玻片上,用针头轻轻拨开菌丝,盖上盖玻片,制成菌丝样品;另外吸取10 μL 孢子液于载玻片上,盖上盖玻片,制成孢子液样品。利用激光共聚焦显微镜观察胞内活性氧积累情况,最佳激发波长为500 nm,最佳发射波长为525 nm。每个处理3次重复。

1.2.7 抑菌组分对禾谷镰刀菌细胞活性的影响测定

利用FAD和PI双荧光染色法对禾谷镰刀菌细胞的活性进行检测。FAD是一种被非特异性脂酶识别的酶活性探针,进入活细胞会释放出绿色荧光,因此被作为活细胞的指示物;而PI在膜损伤时发出红色荧光,被作为死亡细胞的指示物。采用1.2.6方法获得不同抑菌组分处理后的禾谷镰刀菌菌丝和孢子液,分别加入浓度为5 mg/mL的FDA溶液20 μL 和浓度为1 mg/mL的PI溶液1 μL 。在避光环境下,室温放置8 min,以12 000 r/min离心3 min,弃去上清液,使用0.85% NaCl反复吹打,清洗4~5次,充分去除未进入细胞内的染色剂。用镊子将菌丝取出并置于载玻片上,用针头轻轻拨开菌丝,盖上盖玻片,得到菌丝制片。吸取10 μL 孢子液于载玻片上,盖上盖玻片,得到孢子液样品。利用激光共聚焦显微镜观察细胞活性情况,FDA最佳激发波长和最佳发射波长分别为488 nm和530 nm;PI最佳激发波长和最佳发射波长分别为535 nm和615 nm。每个处理3次重复。

1.3 数据分析

使用SPSS 19.0软件对试验数据进行统计分析,采用Duncan氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 禾谷镰刀菌侵染后玉米根系分泌物代谢组分析

2.1.1 LC-MS 分析结果

在负离子及正离子条件下,从禾谷镰刀菌侵染玉米和未侵染玉米的根系分泌物中共检测出1 171种代谢物。PLS-DA结果所示,在负离子条件下,PC1和PC2的得分分别是14.23%和21.40%,且2组样品在轴上分离明显(图1),表明禾谷镰刀菌侵染玉米和未侵染玉米的根系分泌物之间差异显著($P<0.05$),

即玉米被禾谷镰刀菌侵染后,其根系分泌的代谢物会受到影响。

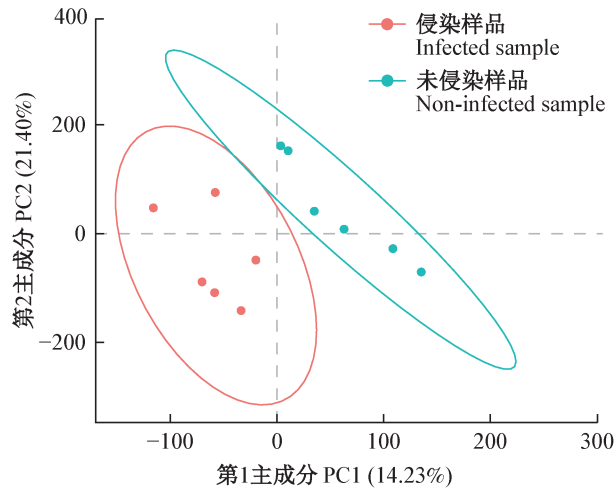


图1 禾谷镰刀菌侵染玉米和未侵染玉米根系分泌物中差异代谢产物在正负离子下的偏最小二乘法判别分析

Fig. 1 Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) of differential metabolites in root exudates of *Fusarium graminearum*-infected and uninfected maize

分析结果显示,禾谷镰刀菌侵染玉米与未侵染玉米的根系分泌物中存在 491 种差异代谢离子;与未侵染样品相比,上调代谢离子有 294 种,下调代谢离子有 197 种。侵染样品和未侵染样品之间有大量代谢物的表达量差异显著,意味着玉米根部代谢发

生了明显变化,有多种代谢物共同参与玉米对禾谷镰刀菌侵染的响应。

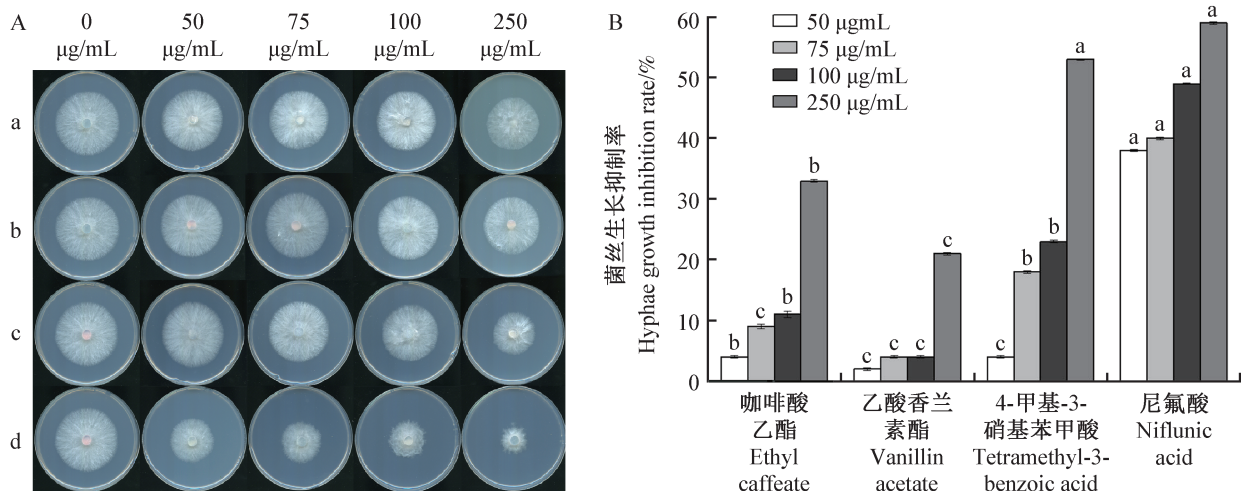
2.1.2 差异代谢组分析

利用 KEGG 数据库对差异代谢物进行注释,共鉴定出 34 种差异代谢物,包括有机杂环化合物、苯类、有机氧化合物、核苷、核苷酸及其类似物、苯丙烷和聚酮化合物、脂质和类脂质分子、碳氢化合物、有机酸及其衍生物等,其中上调表达的代谢物有 22 种,包括对苯二甲酸、腺嘌呤、酪氨酸、月桂酸和阿魏酸等,下调表达的代谢物有 12 种,包括 3-甲基吡啶、肌苷、异亮氨酸、次黄嘌呤和邻苯二甲酸二乙酯等,推测这些差异代谢物可能在玉米根系响应禾谷镰刀菌的侵染中发挥着重要作用。

2.2 玉米根系分泌物抑菌组分的筛选及其作用

2.2.1 对菌丝生长直径的影响

在上调表达差异代谢物中,尼氟酸、咖啡酸乙酯、4-甲基-3-硝基苯甲酸和乙酸香兰素酯均能有效抑制禾谷镰刀菌的菌丝生长(图 2-A)。当达到最高浓度 250 $\mu\text{g/mL}$ 时,尼氟酸、咖啡酸乙酯、4-甲基-3-硝基苯甲酸和乙酸香兰素酯对禾谷镰刀菌菌丝生长的抑制率分别为 59.0%、33.0%、53.0% 和 21.0%,其中尼氟酸的抑菌效果最好,当其浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 时即可明显抑制禾谷镰刀菌菌丝生长,抑制率显著高于其他 3 种抑菌组分(图 2-B)。



A: 禾谷镰刀菌菌丝生长 3 d 时, a~d 分别为咖啡酸乙酯、乙酸香兰素酯、4-甲基-3-硝基苯甲酸和尼氟酸。A: Growth of *Fusarium graminearum* mycelium for 3 d, a~d are ethyl caffeate, vanillin acetate, tetramethyl-3-benzoic acid and niflunic acid, respectively.

图2 4种上调表达差异组分对禾谷镰刀菌菌丝生长的影响

Fig. 2 Growth of *Fusarium graminearum* after treatment with four differential components

图中数据为平均数 $\pm$ 标准差。同色柱上不同小写字母表示不同处理间经 Duncan 氏新复极差法检验差异显著 ($P < 0.05$)。Data are mean $\pm$ SD. Different lowercase letters on the same color bars indicate significant difference among different treatments by Duncan's new multiple range test ($P < 0.05$).

2.2.2 对禾谷镰刀菌产孢量的影响

尼氟酸、咖啡酸乙酯、4-甲基-3-硝基苯甲酸和乙酸香兰素酯均能明显抑制禾谷镰刀菌孢子的产生,其中尼氟酸的抑制效果最好,当浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$

时抑制率达到 96.0%, 50 $\mu\text{g/mL}$ 处理的抑制率为 71.0%; 4-甲基-3-硝基苯甲酸和乙酸香兰素酯对禾谷镰刀菌产孢的抑制效果次之, 咖啡酸乙酯的抑制效果最差(表 1)。

表 1 抑菌组分对禾谷镰刀菌产孢量的影响

Table 1 Effects of antifungal components on sporulation of *Fusarium graminearum*

组分 Component	0 $\mu\text{g/mL}$		50 $\mu\text{g/mL}$		100 $\mu\text{g/mL}$	
	产孢量/($\times 10^5$ 个/mL)	抑制率	产孢量/($\times 10^5$ 个/mL)	抑制率	产孢量/($\times 10^5$ 个/mL)	抑制率
	Spore production/ ($\times 10^5$ spores/mL)	Inhibition rate/%	Spore production/ ($\times 10^5$ spores/mL)	Inhibition rate/%	Spore production/ ($\times 10^5$ spores/mL)	Inhibition rate/%
咖啡酸乙酯 Ethyl caffeate	15.0 $\pm$ 4.6	—	11.0 $\pm$ 1.6 a	26.0 $\pm$ 13.1 c	10.0 $\pm$ 4.5 a	38.0 $\pm$ 13.2 c
乙酸香兰素酯 Vanillin acetate	15.0 $\pm$ 4.6	—	9.3 $\pm$ 2.4 a	38.0 $\pm$ 19.1 ab	6.3 $\pm$ 1.1 b	58.0 $\pm$ 9.5 b
4-甲基-3-硝基苯甲酸 Tetramethyl-3-benzoic acid	15.0 $\pm$ 4.6	—	9.7 $\pm$ 0.1 a	35.0 $\pm$ 1.0 b	4.9 $\pm$ 0.7 c	67.0 $\pm$ 5.3 b
尼氟酸 Niflunic acid	15.0 $\pm$ 4.6	—	4.4 $\pm$ 0.2 b	71.0 $\pm$ 2.3 a	0.6 $\pm$ 0.1 d	96.0 $\pm$ 1.2 a

表中数据为平均数 $\pm$ 标准差。同列不同小写字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验差异显著 ($P < 0.05$)。Data are mean $\pm$ SD. Different lowercase letters in the same column indicate significant difference by Duncan's new multiple range test ($P < 0.05$).

2.2.3 对禾谷镰刀菌孢子萌发的影响

尼氟酸和 4-甲基-3-硝基苯甲酸对禾谷镰刀菌孢子萌发有显著的抑制作用,其中尼氟酸的抑制效果最好,培养 12 h 时禾谷镰刀菌孢子的萌发率仅为 40.0%,显著低于对照,且培养 3 h 时对孢子萌发

的抑制率就达到 87.0%,显著高于其他 3 种抑菌组分;其次为 4-甲基-3-硝基苯甲酸,培养 6 h 的孢子萌发率为 77.0%,显著低于对照;而乙酸香兰素酯和咖啡酸乙酯的抑制效果最差,培养 6 h 的孢子萌发率分别达到 96.0% 和 99.0%(表 2)。

表 2 抑菌组分对禾谷镰刀菌孢子萌发的影响

Table 2 Effects of antifungal components on spore germination of *Fusarium graminearum*

组分 Component	3 h		6 h		12 h	
	萌发率	抑制率	萌发率	抑制率	萌发率	抑制率
	Germination rate/%	Inhibition rate/%	Germination rate/%	Inhibition rate/%	Germination rate/%	Inhibition rate/%
对照 Control	97.0 $\pm$ 0.6 a	—	99.0 $\pm$ 0.5 a	—	99.0 $\pm$ 0.0 a	—
咖啡酸乙酯 Ethyl caffeate	94.0 $\pm$ 1.0 b	3.0 $\pm$ 0.8 d	99.0 $\pm$ 0.5 a	1.0 $\pm$ 0.5 d	99.0 $\pm$ 0.5 a	1.0 $\pm$ 0.5 b
乙酸香兰素酯 Vanillin acetate	88.0 $\pm$ 1.2 c	9.0 $\pm$ 1.0 c	96.0 $\pm$ 0.5 b	3.0 $\pm$ 0.5 c	99.0 $\pm$ 0.5 a	1.0 $\pm$ 0.5 b
4-甲基-3-硝基苯甲酸 Tetramethyl-3-benzoic acid	70.0 $\pm$ 9.0 d	38.0 $\pm$ 7.5 b	77.0 $\pm$ 0.5 c	22.0 $\pm$ 0.5 b	97.0 $\pm$ 0.5 b	2.0 $\pm$ 0.5 b
尼氟酸 Niflunic acid	12.5 $\pm$ 2.5 e	87.0 $\pm$ 2.1 a	33.0 $\pm$ 1.7 d	67.0 $\pm$ 1.7 a	40.0 $\pm$ 3.4 c	59.0 $\pm$ 3.4 a

表中数据为平均数 $\pm$ 标准差。同列不同小写字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验差异显著 ($P < 0.05$)。Data are mean $\pm$ SD. Different lowercase letters in the same column indicate significant difference by Duncan's new multiple range test ($P < 0.05$).

2.2.4 抑菌组分对禾谷镰刀菌胞内活性氧积累的影响

与对照相比,乙酸香兰素酯处理后禾谷镰刀菌菌丝的绿色荧光更强(图 3-A);而 4-甲基-3-硝基苯甲酸和尼氟酸处理后禾谷镰刀菌孢子产生的绿色荧光更强烈(图 3-B),表明乙酸香兰素酯能够诱导禾谷镰刀菌菌丝累积大量活性氧,而 4-甲基-3-硝基苯甲酸和尼氟酸则诱导禾谷镰刀菌孢子累积活性氧。

2.2.5 抑菌组分对禾谷镰刀菌细胞活性的影响

与对照相比,尼氟酸和 4-甲基-3-硝基苯甲酸处

理后禾谷镰刀菌菌丝出现大量的红色荧光,表明处理的菌丝细胞受到严重损伤甚至死亡(图 4-A);而尼氟酸和 4-甲基-3-硝基苯甲酸处理后禾谷镰孢菌孢子悬浮液发出强烈的红色荧光,表明尼氟酸和 4-甲基-3-硝基苯甲酸处理后也能导致孢子死亡(图 4-B)。

3 讨论

大麦根系分泌物中的糖类和酚类物质能够抑制禾谷镰刀菌的生长(Olanrewaju et al., 2019; Feng et

al., 2021)。本研究首先利用非靶向代谢组学分析手段研究禾谷镰刀菌侵染对玉米根系分泌物的影响, 再通过菌丝生长速率试验检测差异组分的抑菌活性, 筛选出能够有效抑制禾谷镰刀菌生长的4种组分, 分别是尼氟酸、咖啡酸乙酯、4-甲基-3-硝基苯甲

酸和乙酸香兰素酯。刘芳等(2021)研究结果表明, 尼氟酸能够显著降低水稻对重金属铊的吸收; 目前尼氟酸已被广泛用于医学药物研究方面(Fairman et al., 1995), 而本研究首次测定了尼氟酸对禾谷镰刀菌的抑制效果。

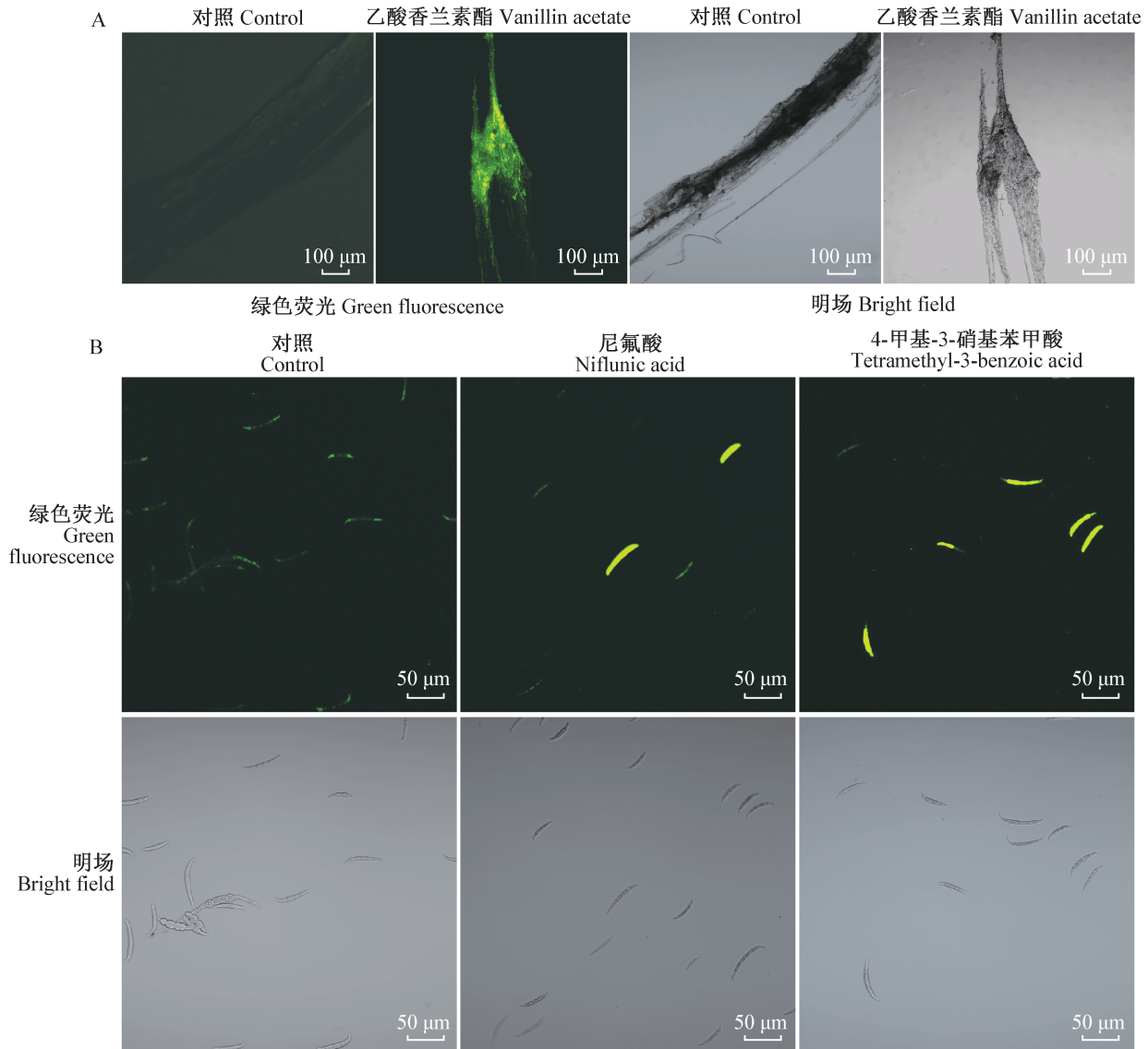


图3 抑菌组分对禾谷镰刀菌菌丝(A)和分生孢子(B)活性氧累积的影响

Fig. 3 Effects of antifungal components on reactive oxygen species in mycelium (A) and spores (B) of *Fusarium graminearum*

本研究结果表明, 4种抑菌组分中以尼氟酸对禾谷镰孢菌菌丝生长的抑制效果最好, 且尼氟酸和4-甲基-3-硝基苯甲酸对该菌孢子萌发的抑制效果最强。为进一步研究抑菌组分对禾谷镰刀菌生理特征的影响, 本研究检测了4种抑菌组分处理后该菌的产孢量和孢子萌发情况, 进一步证明了尼氟酸抑制禾谷镰刀菌产孢及孢子萌发的能力最强。通过DCFH荧光标记法和FDA/PI双荧光染色法对禾谷镰刀菌胞内活性氧积累情况及细胞活性进行检测, 证实乙

酸香兰素酯能够诱导禾谷镰刀菌菌丝内活性氧的积累, 4-甲基-3-硝基苯甲酸和尼氟酸则能诱导禾谷镰刀菌孢子内活性氧的累积, 并且4-甲基-3-硝基苯甲酸和尼氟酸均能导致菌丝和孢子死亡。在这些活性成分中, 尼氟酸是一种HCN₂特异性阻断剂, 分子式是C₁₃H₉F₃N₂O₂, 在生物体中用于消炎镇痛, 已被广泛用于阻断内源性Ca²⁺以及作为阴离子通道的抑制剂(Fairman et al., 1995)。4-甲基-3-硝基苯甲酸的分子式为C₈H₇NO₄, 它能抑制多种癌细胞迁移, 并显

示出低细胞毒性(Chen et al., 2011)。本研究中能造成禾谷镰刀菌菌丝活性氧明显积累的乙酸香兰素酯可由香草醛和乙酸酐合成,分子式为 $C_{10}H_{10}O_4$,在一些报道里,香草醛(又名香兰素、4-羟基-3-甲氧基苯甲醛)是一种存在于热带香草兰花中的天然化合物,

已被广泛应用于食品和饮料等工业生产中,并且还能抑制嗜水气单胞菌 *Aeromonas hydrophila* 的生物膜形成来防治水体的生物污染(Ponnusamy et al., 2013)。本研究鉴定到的这4种抑菌物质的具体抑菌机制还需进一步深入研究。

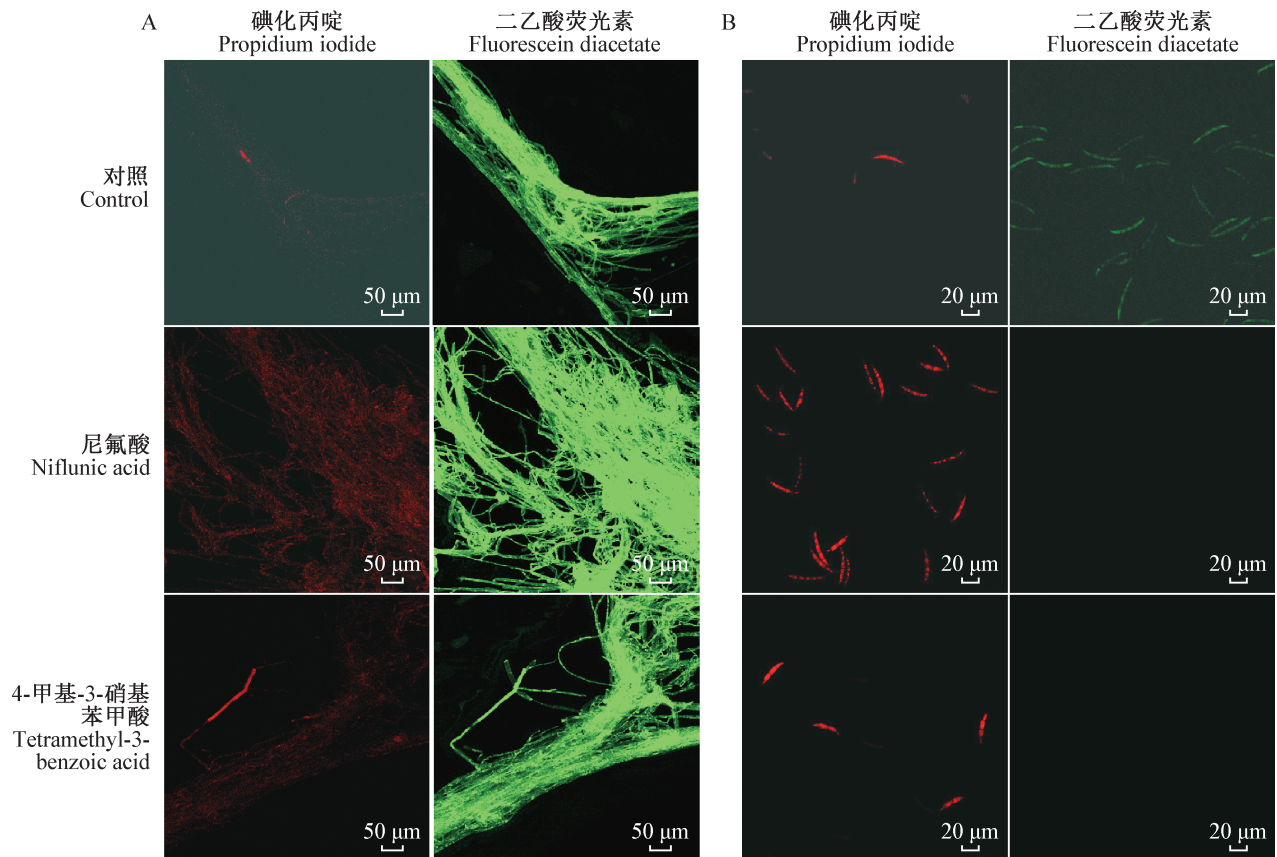


图4 抑菌组分对禾谷镰刀菌菌丝(A)和孢子(B)细胞活性的影响

Fig. 4 Effects of antifungal components on cell viability of hypha (A) and spore (B) of *Fusarium graminearum*

本研究证实禾谷镰刀菌菌丝和孢子细胞中的活性氧发生了异常,而活性氧在细胞中起着双重作用,低水平活性氧能参与细胞存活信号的调节,而活性氧水平过高时会破坏细胞结构,从而引起氧化损伤甚至导致细胞凋亡,这往往是细胞氧化损伤的主要原因(郭怀刚等,2022)。正常状态下,机体中产生和清除活性氧的速率处于动态平衡,当机体内自由基含量增加或抗氧化酶系统动力不足以清除多余的自由基时,这种动态平衡被打破,从而引发机体内的氧化应激,这可能会削弱内源性抗氧化系统,从而增加细胞的氧化损伤(Tudzynski et al., 2012; 郭怀刚等, 2022)。推测其原因可能是细胞机体产生的活性氧使细胞内部受损甚至坏死,但尼氟酸和4-甲基-3-硝基苯甲酸导致禾谷镰刀菌菌丝和孢子死亡的具体原因还需要进一步研究。

参考文献 (References)

- Chen P, Zhang XF, Guo H, Ma N, Li MH, Liu Z, Zhang N, Hao XS. 2011. Effect of 4-methyl-3-nitrobenzoic acid on non-small cell lung cancer cell migration. *Molecular Medicine Reports*, 4(5): 947-953
- Ding N, Lin H, Zhang XH, He Y, Yu G. 2022. Interaction mechanism between root secretion and rhizosphere microorganisms: a review. *Chinese Journal of Soil Science*, 53(5): 1212-1219 (in Chinese) [丁娜, 林华, 张学洪, 贺瑶, 俞果. 2022. 植物根系分泌物与根际微生物交互作用机制研究进展. *土壤通报*, 53(5): 1212-1219]
- Du JY. 2022. Effects of root exudates on *Arabidopsis* rhizosphere microbes. Master thesis. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences [杜佳阳. 2022. 根系分泌物对拟南芥根际微生物的影响. 硕士学位论文. 北京: 中国科学院大学]
- Fairman WA, Vandenberg RJ, Arriza JL, Kavanaugh MP, Amara SG. 1995. An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature*, 375(6532): 599-603

- Feng HC, Fu RX, Hou XQ, Lv Y, Zhang N, Liu YP, Xu ZH, Miao YZ, Krell T, Shen QR, et al. 2021. Chemotaxis of beneficial rhizobacteria to root exudates: the first step towards root-microbe rhizosphere interactions. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13): 6655
- Gao XF. 2017. Root exudates of dominant plants and the effects of their main components on soil microorganisms in *Stipa breviflora* desert steppe. PhD thesis. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University (in Chinese) [高雪峰. 2017. 短花针茅荒漠草原优势植物根系分泌物及其主要组分对土壤微生物的影响. 博士学位论文. 呼和浩特: 内蒙古农业大学]
- Guo HG, Zhao CJ, Wu YB. 2022. Effects of *Rhizoctonia solani* on reactive oxygen species and antioxidant enzyme activities of sorghum seedlings. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 42(5): 796–802 (in Chinese) [郭怀刚, 赵长江, 吴亚滨. 2022. 立枯丝核菌对高粱幼苗活性氧及抗氧化酶活性的影响. 西北植物学报, 42(5): 796–802]
- Li MX, Liu MY, Wang BY, Shi L. 2022. Metabonomics analysis of stem extracts from *Dalbergia sissoo*. *Molecules*, 27(6): 1982
- Li WY, Chen HH, Yuan YJ, Liu QQ, Yang H, Bao QB. 2022. Inhibitory effect of ClO₂, clove essential oil and cinnamon essential oil against mycelial growth and spore germination of *Fusarium graminearum*. *Science and Technology of Cereals, Oils and Foods*, 30(2): 197–206 (in Chinese) [李汶玥, 陈虹宏, 袁永俊, 刘庆庆, 杨浩, 包清彬. 2022. 二氧化氯及丁香、肉桂精油对禾谷镰刀菌生长和孢子萌发的抑制研究. 粮油食品科技, 30(2): 197–206]
- Liu F, Wang MY, Yang RQ, Yang ZN, Zhang P, Yao Y. 2021. Relationship between oxalate content and thallium absorption in rice (*Oryza sativa* L.) roots under thallium stress. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 23(3): 34–40 (in Chinese) [刘芳, 王摸云, 杨睿祺, 杨钊楠, 张平, 姚焱. 2021. 重金属铊胁迫下水稻(*Oryza sativa* L.)根系草酸含量与铊吸收的关系. 中国农业科技导报, 23(3): 34–40]
- Liu FF, Zhang AH, Lei FJ, Xu YH, Zhang LX. 2018. Inhibiting effects of total ginsenosides of ginseng stems and leaves against *Fusarium solani* and their antibacterial mechanism. *Journal of Jilin Agricultural University*, 40(1): 85–91 (in Chinese) [刘芳芳, 张爱华, 雷峰杰, 许永华, 张连学. 2018. 人参茎叶总皂苷对腐皮镰刀菌的抑制作用及抑菌机理. 吉林农业大学学报, 40(1): 85–91]
- Lombardi N, Vitale S, Turrà D, Reverberi M, Fanelli C, Vinale F, Marra R, Ruocco M, Pascale A, D'Errico G, et al. 2018. Root exudates of stressed plants stimulate and attract *Trichoderma* soil fungi. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 31(10): 982–994
- Mao MX, Zhu F. 2021. Progress and perspective in research on plant resistance mediated by root exudates. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 29(10): 1649–1657 (in Chinese) [毛梦雪, 朱峰. 2021. 根系分泌物介导植物抗性研究进展与展望. 中国生态农业学报(中英文), 29(10): 1649–1657]
- Ning S. 2013. The effect of the storage time on bracken (*Pteridium aquilinum* Kuhn) spores viability and physiological characteristics. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 28(S1): 256–258 (in Chinese) [宁胜. 2013. 储存时间对蕨菜孢子活力及生理特性的影响. 华北农学报, 28(S1): 256–258]
- Olanrewaju OS, Ayangbenro AS, Glick BR, Babalola OO. 2019. Plant health: feedback effect of root exudates-rhizobiome interactions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(3): 1155–1166
- Ponnusamy K, Kappachery S, Thekeettle M, Song JH, Kweon JH. 2013. Anti-biofouling property of vanillin on *Aeromonas hydrophila* initial biofilm on various membrane surfaces. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(9): 1695–1703
- Qin ZH, Ren X, Jiang K, Wu XF, Yang ZH, Wang XM. 2014. Identification of *Fusarium* species and *F. graminearum* species complex causing maize ear rot in China. *Journal of Plant Protection*, 41(5): 589–596 (in Chinese) [秦子惠, 任旭, 江凯, 武小菲, 杨知还, 王晓鸣. 2014. 我国玉米穗腐病致病镰孢种群及禾谷镰孢复合种的鉴定. 植物保护学报, 41(5): 589–596]
- Song GM, Xu Y, Zhang ZQ, Chen YF, Jia MZ, Wen JZ. 2019. Effects of non-host and host seed exudates on the activity of oomycete pathogen *Phytophthora sojae*. *Journal of Plant Protection*, 46(4): 730–737 (in Chinese) [宋光梅, 徐莹, 张卓群, 陈宇飞, 贾梦琪, 文景芝. 2019. 非寄主和寄主种子分泌物对大豆疫霉活性的影响. 植物保护学报, 46(4): 730–737]
- Surender Reddy P, Jogeswar G, Rasineni GK, Maheswari M, Reddy AR, Varshney RK, Kavi Kishor PB. 2015. Proline over-accumulation alleviates salt stress and protects photosynthetic and antioxidant enzyme activities in transgenic sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 94: 104–113
- Tudzynski P, Heller J, Siegmund U. 2012. Reactive oxygen species generation in fungal development and pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology*, 15(6): 653–659
- Xiao RF, Liu B, Zhu YJ, Pan ZZ, Chen MC, Zhan H. 2017. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* isolates revealed by phospholipid fatty acids (PLFAs) biomarkers. *Journal of Plant Protection*, 44(5): 763–770 (in Chinese) [肖荣凤, 刘波, 朱育菁, 潘志针, 陈梅春, 詹洪. 2017. 尖孢镰刀菌磷脂脂肪酸的遗传多样性分析. 植物保护学报, 44(5): 763–770]
- Xiao Y, Pan ZP, Yin CX, Su J, Hu X, Zhu XR, Shan Y, Fu FH. 2020. Antifungal activity and mechanism of ϵ -polylysine against *Geotrichum citri-aurantii*. *Food Science*, 41(19): 221–229 (in Chinese) [肖媛, 潘兆平, 尹春晓, 苏瑾, 胡筱, 朱向荣, 单杨, 付复华. 2020. ϵ -聚赖氨酸对柑橘酸腐菌的抑菌活性及作用机制. 食品科学, 41(19): 221–229]
- Xiong YW, Li XW, Wang TT, Gong Y, Zhang CM, Xing K, Qin S. 2020. Root exudates-driven rhizosphere recruitment of the plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus flexus* KLBMP 4941 and its growth-promoting effect on the coastal halophyte *Limonium sinense* under salt stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 194: 110374
- Zhang Y, He J, Jia LJ, Yuan TL, Zhang D, Guo Y, Wang YF, Tang WH. 2016. Cellular tracking and gene profiling of *Fusarium graminearum* during maize stalk rot disease development elucidates its strategies in confronting phosphorus limitation in the host apoplast. *PLoS Pathogens*, 12(3): e1005485