广东农业科学 2019，46（7）：92–99
Guangdong Agricultural Sciences doi：10.16768/j.issn.1004–874X.2019.07.014

古广武，董辰韵，钟伟强，张安强，林雅铃 . 聚硅氧烷 – 聚丙烯酸酯季铵盐对水稻纹枯病菌细胞膜的影响［J］. 广东农业科学，2019，46（7）：92–99.

聚硅氧烷 – 聚丙烯酸酯季铵盐对水稻纹枯病菌细胞膜的影响

古广武[1]，董辰韵[1]，钟伟强[2]，张安强[2]，林雅铃[1]
（1. 华南农业大学材料与能源学院，广东 广州 510642；
2. 华南理工大学材料科学与工程学院，广东 广州 510641）

摘 要：【目的】研究聚硅氧烷 – 聚丙烯酸酯季铵盐嵌段共聚物（Six–Q_5）对水稻纹枯病菌（*Rhizoctonia solani*）细胞膜的影响，为水稻纹枯病的防治提供新思路。【方法】通过 PI 染色后在微分干涉显微镜下观察菌丝形态表征 Si_x–Q_5 对水稻纹枯病菌细胞膜完整性的影响，通过考马斯亮蓝法、蒽酮 – 硫酸法及电导率法表征 Si_x–Q_5 对水稻纹枯病菌细胞膜渗透性的影响，利用丙二醛（MDA）试剂盒测定丙二醛的含量变化表征 Si_x–Q_5 对水稻纹枯病菌细胞膜脂质过氧化的影响。【结果】经过 Si_x–Q_5 处理的菌丝显微镜下可观测到荧光亮斑，菌丝培养液中的蛋白质、碳水化合物和电解质变化均明显区别于对照，水稻纹枯病菌菌丝及菌丝培养液中的 MDA 含量均随着药物浓度的增加而增加，且随着 PDMS 嵌段长度的不同，其对水稻纹枯病菌菌丝细胞膜的影响也有所差别。【结论】实验结果表明，Si_x–Q_5 破坏了水稻纹枯病菌细胞膜的完整性，改变了细胞膜的渗透性及细胞膜的结构功能完整性；且随着 Si_x–Q_5 嵌段长度增加，其影响更加显著。细胞膜是 Si_x–Q_5 抑制水稻纹枯病菌一个作用靶点。

关键词：聚硅氧烷 – 聚丙烯酸酯季铵盐；嵌段共聚物；水稻纹枯病菌；细胞膜；渗透性；脂质过氧化
中图分类号：S482.2 **文献标志码：**A **文章编号：**1004–874X（2019）07–0092–08

Effect of Polysiloxane–polyacrylate Quaternary Ammonium Salt Block Copolymer on Cell Membrane of *Rhizoctonia solani*

GU Guangwu[1], DONG Chenyun[1], ZHONG Weiqiang[2], ZHANG Anqiang[2], LIN Yaling[1]
（1. *College of Materials and Energy, South China Agricultural University, Guangzhou* 510642, *China;*
2. *School of Material Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou* 510641, *China*）

Abstract:【Objective】The study was to investigate the effect of polysiloxane–polyacrylate quaternary ammonium salt block copolymer (Si_x–Q_5) on cell membrane of *Rhizoctonia solani*, and to provide a new idea for the control of rice sheath blight.【Method】The effects of Si_x–Q_5 on cell membrane integrity of *R. solani* were observed under differential interference microscopy after PI staining. The effects of Si_x–Q_5 on cell membrane permeability of *R. solani* were characterized by Coomassie brilliant blue method, anthrone–sulfuric acid method and conductivity method, respectively. Malondialdehyde (MDA) kit was used to determine the content of MDA to characterize the effect of Si_x–Q_5 on lipid peroxidation of cell membrane of *R. solani*.【Result】Under the fluorescence microscope, the mycelia treated with Si_x–Q_5 are observed with fluorescent bright spots. It is found that the protein, carbohydrate and electrolyte contents in the mycelium culture medium

收稿日期：2019–04–30
基金项目：广州市科技计划项目（201704020084，201803020015）；国家自然科学基金（31772202）
作者简介：古广武（1996—），男，在读硕士生，研究方向为植物病害化学防治，E–mail：758898263@qq.com
通信作者：林雅铃（1978—），女，博士，副教授，研究方向为植物病害化学防治，E–mail：linyaling@scau.edu.cn

of the treatment are significantly different from those of the control. The MDA content of mycelia and culture medium in the treatment increased with the increas of drug concentration. With the difference of PDMS block length, its influence on the *R. solani* mycelia membrane is also different.【Conclusion】The results show that Si_x–Q_5 destroy the integrity of cell membrane, chang the permeability of cell membrane and the structural and functional integrity of cell membrane. Moreover, with the increase of the block length of Si_x–Q_5, the effect is more pronounced. Cell membrane is a target of Si_x–Q_5 for inhibiting rice sheath blight.

Key words: polysiloxane–polyacrylate quaternary ammonium salt; block copolymer; *Rhizoctonia solani*; cell membrane; permeability; lipid peroxidation

【研究意义】由立枯丝核菌（*Rhizoctonia solani*）引起的水稻纹枯病（rice sheath blight）是我国水稻三大病害之一[1]。近年来，由于矮秆品种的推广和栽培水平的提高，水稻纹枯病的发生呈加重趋势[2]。目前，水稻纹枯病的防治主要以使用井冈霉素为主，但从多年使用情况来看，对水稻纹枯病的防效仅50%~60%，且持效期短，需要频繁施药，由此带来大量的劳力用工成本及抗药性问题[3-4]。因此，研究开发新的防治药剂对于水稻的安全生产具有重要意义。【前人研究进展】季铵盐是一类广谱杀菌剂，因其制备方法简单、生产成本较低、物理化学性质较好，并且抗菌效果较好，被广泛应用于医学、食品、化妆品以及工业污水处理等方面[5]。季铵盐的抑菌机理主要表现在以下两方面：一方面季铵盐本身的阳离子通过静电作用吸附在菌体表面，穿过细胞壁到达细胞膜[6]，当聚集的季铵盐达到一定浓度，其疏水链会嵌入细胞膜中形成胶束体，破坏细胞结构，进而造成细胞内容物流出，导致细胞死亡[7]；另一方面，季铵盐通过与细胞膜上的蛋白结合或者破坏细胞膜上的酶，进而破坏细胞膜，从而达到杀死细胞的作用[5]。小分子季铵盐是指一类R基链较短的，且分子量小于500 g/mol，具有季铵盐结构的有机物。虽然小分子季铵盐对于微生物具有良好的抑菌效果，但是小分子季铵盐具有易挥发、稳定性差及环境毒性大的缺点[8]。大分子季铵盐是指分子量大于200 g/mol的具有季铵盐结构的聚合物，也有一些天然高分子材料的改性聚合物[6]。相较于小分子季铵盐，聚硅氧烷季铵盐具有稳定性好、环境毒性小、刺激性小、两亲性强及吸附性能更好等优点[9-10]。本课题前期研究表明大分子季铵盐的分子结构对其抑菌活性有较大影响，前期合成的聚二甲基硅氧烷接枝季铵盐（PDMS–g–BC）和聚丙烯酰胺季铵盐（PQD–BC）两种大分子季铵盐具有引起菌体细胞膜发生脂质过氧化的功能，这是小分子季铵盐不具备的[11]。聚硅氧烷–聚丙烯酸酯季铵盐嵌段共聚物具有不同于PDMS–g–BC和PQD–BC的结构，有必要深入探究其对R. solani细胞膜的影响。【本研究切入点】通过对细胞膜的完整性、渗透性以及细胞膜的脂质过氧化反应来表征聚硅氧烷–聚丙烯酸酯季铵盐嵌段共聚物对水稻纹枯病菌细胞膜的影响，旨在为揭示两亲性大分子季铵盐防治水稻纹枯病菌的作用机制提供科学依据。【拟解决的关键问题】聚硅氧烷–聚丙烯酸酯季铵盐嵌段共聚物不仅具有小分子季铵盐的良好抑菌效果，还具有区别于小分子季铵盐对于菌体细胞膜的抑菌机理。因此，可以通过研究其对菌体细胞膜的完整性、渗透性与功能性的影响，探索聚硅氧烷–聚丙烯酸酯季铵盐嵌段共聚物在水稻纹枯病菌的作用机理及其在防治水稻纹枯病中的实际应用价值。

1 材料与方法

1.1 试验材料

立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani* Kühn AG–1(IA)，由华南农业大学农学院植物病理学系真菌实验室惠赠。

PDMS–b–(PDMAEMA–BC)的化学名为聚二甲基硅氧烷–b–聚(二甲氨基丙基甲基丙烯酸酯–苄基氯化铵)嵌段共聚物，是一类新型两亲性大分子季铵盐（Si_x–Q_5，x = 0、2、5），按文献[12]采用原子转移自由基聚合方法（ATRP）合成。Si_0–Q_5、Si_2–Q_5与Si_5–Q_5的PDMS嵌段长度分别为0、2×10^3、5×10^3 ku，PDMAEMA–BC嵌段的长度为5×10^3 ku。

培养基与主要试剂：PD培养基和PDA培养基按文献[13]的方法配置。牛血清白蛋白（BSA）：生工生物工程有限公司；碘化丙啶（PI染液）：上海阿拉丁生化科技股份有限公司；考马斯亮蓝

G-250：广州威佳科技有限公司；蒽酮：分析纯，上海润捷化学试剂有限公司；硫酸：分析纯，广州化学试剂厂；三氯乙酸（TCA）：分析纯，国药集团化学试剂有限公司。

主要仪器：荧光显微镜：型号 Eclipse 80i，日本 Nikon 公司；紫外可见分光光度计：型号 UV2300，上海天美科学仪器有限公司；电导率仪：型号 DDS-11A，上海虹益仪器仪表有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 Si_x-Q_5 对 *R. solani* 细胞膜完整性的影响表征 （1）菌种活化：从斜面保存的试管中挑取 *R. solani* 菌丝，接种于 PDA，于 28℃培养箱培育 48 h；用 7 mm 打孔器从培育 2 d 后的 *R. solani* 菌落边缘打取菌碟，接种于新的 PDA 平板培育 48 h。

（2）菌液培养：从活化后的 *R. solani* 菌落边缘打取菌碟，将 3 块打取好的菌碟投入到 45 mL PD 培养基中，在 28℃下以 120 r/min 摇床中孵育 48 h，可得菌液。

（3）菌种培养：在超净工作台中配制不同浓度季铵盐溶液 5 mL，之后加入 45 mL 菌液中，使其终浓度为 0.5×IC_{50}、IC_{50}、IC_{90}，在 28℃培养箱孵育 2 d。

挑取适量孵育后的菌丝于匀浆器，加入 1 mL PBS 缓冲液匀浆，取适量于血球计数板计数，制成菌悬液。取 1 mL 菌悬液于 1.5 mL 离心管中，10 000 r/min 离心 5 min，弃上清，加入 1 mL PBS 重悬，10 000 r/min 离心 5 min，弃上清，重复 2 次，洗去培养液备用。加入 100 μL PI 染液（10 μg/mL），于 28℃培养箱中遮光培养 1 h，10 000 r/min 离心 5 min，弃上清，加入 1 mL PBS 重悬，10 000 r/min 离心 5 min，弃上清，重复 2 次，洗去 PI 染液备用。取 5 μL 试样于载玻片，盖上盖玻片制成临时玻片，于荧光显微镜下观察。

1.2.2 Si_x-Q_5 对 *R. solani* 细胞膜渗透性的影响表征 根据 1.2.1 试验方法获得菌液，孵育 48 h 后抽滤得到菌丝备用，称取季铵盐，用蒸馏水定容至 50 mL，使其终浓度为 0.5×IC_{50}、IC_{50}、IC_{90}。

（1）蛋白质含量测定：称取 10 mg 牛血清白蛋白标准品（BSA）定容于 20 mL 蒸馏水，得 0.5 mg/mL 对照品溶液，分别取 0.00、0.03、0.06、0.09、0.12、0.15、0.18、0.21 mL，分别加入 1 mL 蒸馏水混匀；以 1 mL 蒸馏水为空白对照，加入 5 mL 考马斯亮蓝染色，静置 5 min 后，在波长 595 nm 处测定蛋白质对照品的吸光度 A_{595}。用吸光度对浓度进行线性回归，求取标准曲线[14]。称取 0.2 g 菌丝置于配置好的各浓度季铵盐溶液，设定两组空白对照：用等量灭菌水代替季铵盐以及不含菌丝的各浓度季铵盐。每个处理 3 次重复，于 28℃、120 r/min 孵育，在 0、2、4、6、8、24 h 分别测定溶液中蛋白质含量，根据标准曲线计算含量，并且按照式（1）换算成单位质量菌丝的渗透量。

$$\text{菌丝体内含物含量}(mg/g)=\frac{\text{药液中渗透物含量}(mg/mL)\times\text{药液体积}(mL)}{\text{菌丝量}(g)} \quad (1)$$

（2）碳水化合物含量测定：称取 10 mg 葡萄糖标准品定容于 10 mL 得到 1 mg/mL 对照品溶液，分别取 0、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.8、1 mL 加水至 1 mL，加入 5 mL 蒽酮 – 硫酸溶液，沸水浴 15 min，冷水浴 10 min，在 620 nm 处测定吸光度 A_{620}。用吸光度对浓度进行线性回归，求标准曲线[15]。称取 0.2 g 菌丝于各浓度季铵盐溶液，对照组设定同蛋白质含量测定实验。每个处理 3 次重复，于 28℃、120 r/min 孵育，在 0、2、4、6、8、24 h 分别测定溶液中葡萄糖含量变化，根据标准曲线计算含量，并且按照式（1）换算成单位质量菌丝的渗透量。

（3）电解质含量测定：称取 0.2 g 菌丝于各浓度季铵盐溶液，对照组设定同蛋白质含量测定实验。每个处理 3 次重复，于 28℃、120 r/min 孵育，使用 DDS-11A 型电导率仪在 0、0.5、1、2、3、6、9、24 h 分别测定溶液中电导率的变化[11]。

1.2.3 Si_x-Q_5 对 *R. solani* 细胞膜脂质过氧化的影响表征 根据 1.2.1 试验方法获得菌液，孵育 48 h 后抽滤得到菌丝备用，称取季铵盐，用蒸馏水定容至 50 mL，使其终浓度为 0.5×IC_{50}、IC_{50}、IC_{90}。称取 0.2 g 菌丝于不同浓度季铵盐溶液，对照组设定同蛋白质含量测定，每个处理 3 次重复，于 28℃、120 r/min 孵育 24 h 后抽滤，分别收集菌丝和培养液。

称取 0.2 g 菌丝，加入 10% 三氯乙酸（TCA）2 mL 和少量石英砂，冰浴下研磨充分，加 10 % 三氯乙酸 6 mL 进一步研磨，取匀浆于高速冷冻离心机 10 000 r/min、4℃下离心 10 min 得到上清液为样品提取液。用丙二醛（MDA）试剂盒测定菌丝（样品提取液）和培养液 MDA 含量，采用式（2）

求 MDA 含量。

$$\text{MDA 含量} = \frac{\text{测定管吸光度} - \text{测定空白管吸光度}}{\text{标准管吸光度} - \text{标准空白管吸光度}} \times \text{标准品浓度} \times \text{样品测试前稀释倍数} \quad (2)$$

2 结果与分析

2.1 Si_x–Q_5 对 *R. solani* 细胞膜完整性的影响

为了研究 3 种不同结构的 Si_x–Q_5 对 *R. solani* 细胞膜完整性的影响，本试验运用 PI 荧光染料，分别对经过 3 种具有不同嵌段结构的 Si_x–Q_5 处理的水稻纹枯病菌菌丝染色，随后在 535 nm 绿色激发光下观察菌丝发射荧光的情况，并与其在自然光（白光）照射下的明场图片对比。由于 PI 染料分子无法通过完整的细胞膜，却可通过受损的细胞膜进入细胞与遗传物质结合[16]。因此，可用 PI 染色法来检测 Si_x–Q_5 系列两亲性大分子季铵盐在 3 种浓度下对水稻纹枯病菌菌丝细胞膜完整性的影响。

图 1 为 3 种 Si_x–Q_5 对 *R. solani* 菌丝细胞膜完整性影响情况，图中白光为亮场下观察到的菌丝形态，荧光为在绿色激发光下观察到的菌丝形态，其中菌丝内部若能观察到红点，表示菌丝细胞膜完整性被破坏，PI 染料与细胞膜内核酸结合。从图 1 可以看出，随着 Si_x–Q_5 处理浓度的增大，*R. solani* 菌丝内荧光从无到有，且荧光强度逐渐增强。其中，不含 PDMS 嵌段的 Si_x–Q_5（即 Si_0–Q_5）对 *R. solani* 菌丝细胞膜完整性的影响不大，图中不能看到明显红色荧光亮点；而含较短 PDMS 嵌段的 Si_x–Q_5（即 Si_2–Q_5）在高浓度（IC_{90}）处理下，能看到明显红色荧光亮斑，说明在高浓度（IC_{90}）处理下，*R. solani* 菌丝细胞膜完整性被破坏，PI 染料进入菌丝内部，与菌丝内部核酸结合；含较长 PDMS 嵌段的 Si_x–Q_5（即 Si_5–Q_5）处理后，低浓度（$0.5 \times IC_{50}$）处理下就可观察到红色荧光亮斑。表明随着 Si_x–Q_5 中 PDMS 嵌段长度的增加，吸附性较强的两亲性大分子季铵盐更易吸附于菌丝表面，对菌丝细胞膜完整性的破坏作用更强。

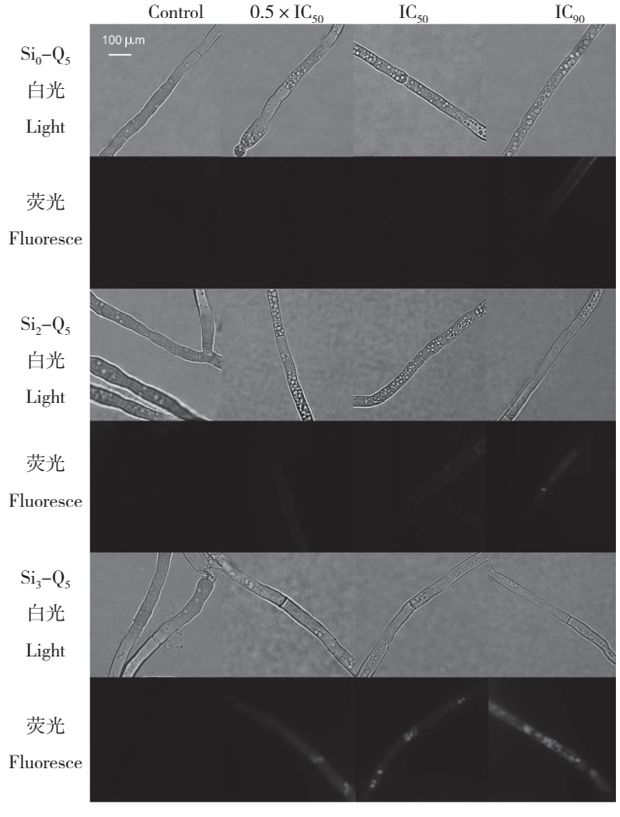


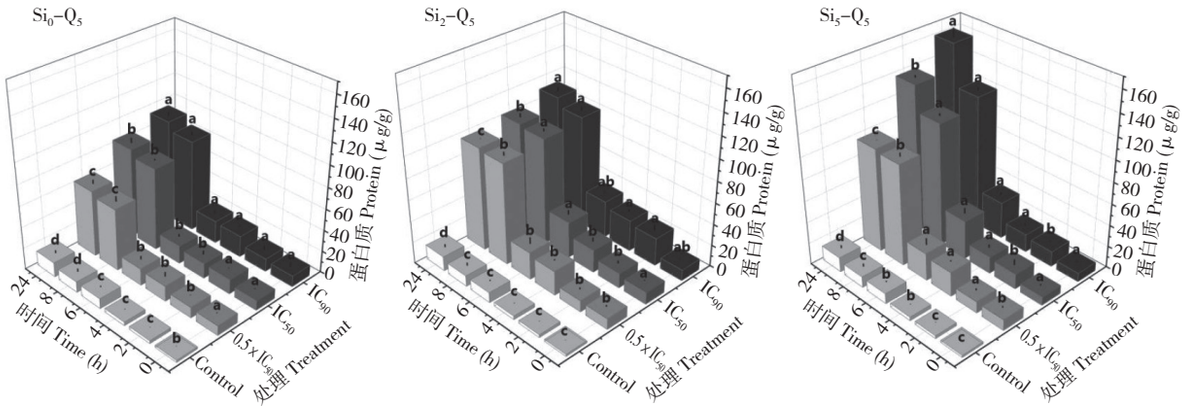
图 1 Si_x–Q_5 对 *R. solani* 菌丝细胞膜完整性的影响
Fig. 1 Effect of Si_x–Q_5 on cell membrane integrity of *R. solani* mycelium

2.2 Si_x–Q_5 对 *R. solani* 细胞膜渗透性的影响

本试验通过考马斯亮蓝染色检测蛋白质含量变化，蒽酮 – 硫酸比色法检测碳水化合物的含量变化，以及采用电导率仪检测电解质含量的变化；由于细胞膜破裂后胞内外渗透液压失衡会导致细胞内容物漏出到培养液中[13]。因此，可通过检测培养液中的蛋白质、碳水化合物及电解质含量变化判断细胞膜渗透性是否被破坏[17]，以及 Si_x–Q_5 对 *R. solani* 细胞膜的破坏程度。

蛋白质测定标准曲线的回归方程为 $y = 6.53x + 0.0114$，$r^2 = 0.999$，表明在 0.00~0.15 mg/mL 范围内，蛋白质浓度（x）与吸光度（y）呈良好的线性关系。碳水化合物测定标准曲线的回归方程为 $y = 2.61x - 0.00684$，$r^2 = 0.999$，表明在 0.0~0.6 mg/mL 范围内，碳水化合物浓度（x）与吸光度（y）呈良好的线性关系。

经过 3 种 Si_x–Q_5 处理的 *R. solani* 培养液中蛋白质、碳水化合物及电解质含量变化分别见图 2、图 3 和图 4。由图 2、图 3、图 4 可知，3 种 Si_x–Q_5 都能对 R. solani 细胞膜渗透性产生影响，导致细胞内容物发生外泄，对照组及处理组的蛋白质、碳水化合物和电解质含量均随着时间的延长而逐渐上升，表明即使在没有季铵盐处理的情况下，正常的菌丝细胞由于渗透压平衡也会释放蛋白质、碳水化合物和电解质。但经过 3 种 Si_x–Q_5 处理后，蛋白质、碳水化合物和电解质的

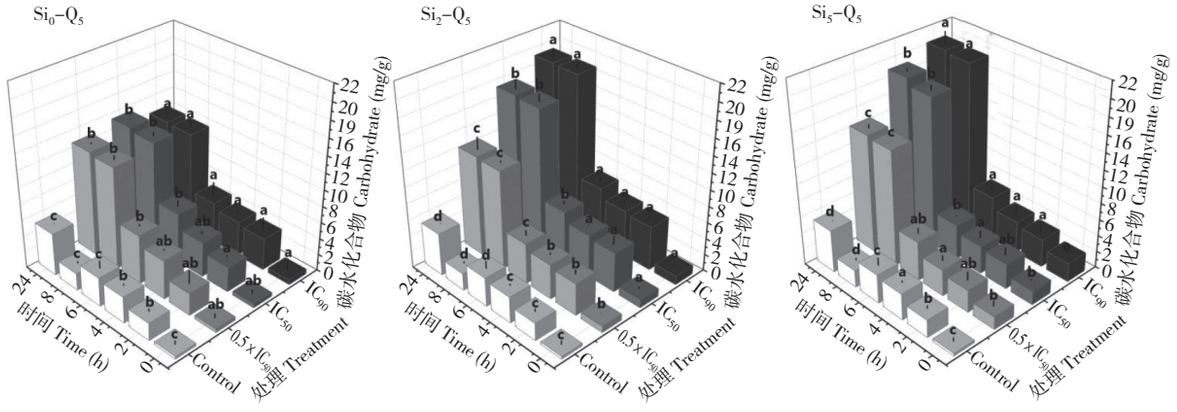


小写英文字母不同者表示处理间差异显著

Different lowercase letters among treaments represent significant difference

图 2　Si_x–Q_5 处理对 *R. solani* 培养液中蛋白质含量的影响

Fig. 2　Effect of Si_x–Q_5 treatment on protein content in *R. solani* culture solution

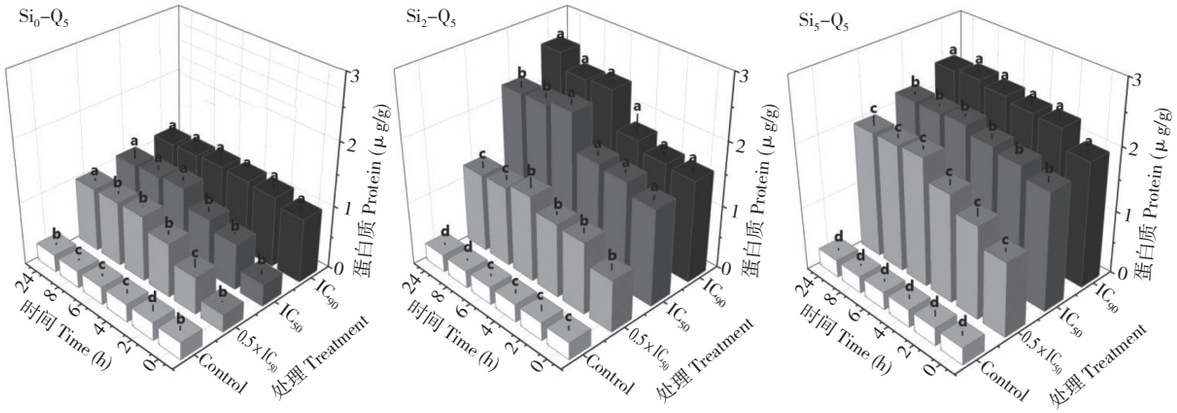


小写英文字母不同者表示处理间差异显著

Different lowercase letters among treaments represent significant difference

图 3　Si_x–Q_5 处理对 *R. solani* 培养液中碳水化合物含量的影响

Fig. 3　Effect of Si_x–Q_5 treatment on carbohydrate content in *R. solani* culture solution



小写英文字母不同者表示处理间差异显著

Different lowercase letters among treaments represent significant difference

图 4　Si_x–Q_5 处理对 R. solani 培养液中电解质含量的影响

Fig. 4　Effect of Si_x–Q_5 treatment on electrolyte content in *R. solani* culture solution

含量随着时间增加得更多，表明经过 Si_x–Q_5 处理后，菌丝细胞膜结构被破坏，细胞内蛋白质、碳水化合物和电解质渗漏速度更快。

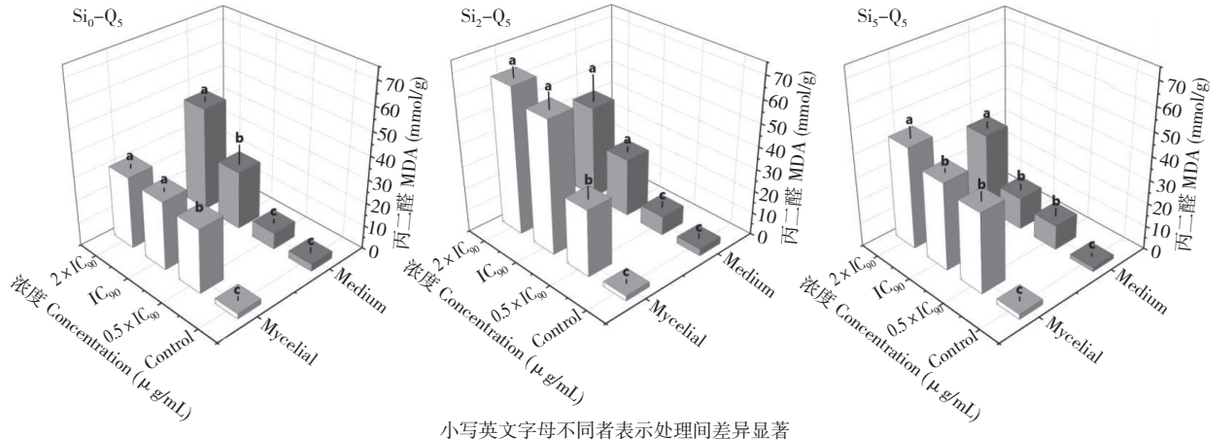
由图 2 可知，经过 3 种 Si_x–Q_5 处理的培养液中的蛋白质含量各不相同。实验结果表明，随着 PDMS 嵌段的增长，培养液中蛋白质含量越高；并且经过 Si_0–Q_5 与 Si_2–Q_5 处理在 8 ~ 24 h 之间的增幅较小，而经过 Si_5–Q_5 处理在 8 ~ 24 h 这段时间内蛋白质的含量还有较明显提高。由图 3 可知，在低浓度处理下，碳水化合物含量在 3 种 Si_x–Q_5 之间无显著差异；而随着浓度的提高与 PDMS 嵌段的增长，其培养液中碳水化合物含量有了一定差异，且嵌段较长的含量更高。如图 2 和图 3 所示，各处理在 8 h 后的蛋白质含量与碳水化合物含量与前 6 h 出现较显著差异，表明在 8 h 蛋白质及碳水化合物的渗透已经达到最大值，并且随着浓度的增加释放量逐渐增加。在处理 8 h 后对比各浓度的不同药物，发现在较高浓度（IC_{50} 和 IC_{90}）下随着嵌段长度的增加，外泄的蛋白质含量也有所增加，而碳水化合物之间则无明显差异。表著随着 PDMS 嵌段的增长、浓度的增加以及在一定时间范围内，Si_x–Q_5 对菌丝细胞膜的破坏程度增大，且 Si_5–Q_5 的破坏效果更持久、更有效。

如图 4 所示，随着处理时间逐渐增加，各处理菌丝培养液的电导率均有一定程度的增加，而对照变化不大。Si_x–Q_5 处理前期（0~1 h）电导率变化不明显，此后电导率随着处理时间逐渐增加而增加，中、高浓度处理电导率差别不大，但显著区别于低浓度处理，直到 9 h 后各处理的电导率值均出现微弱的减小趋势。在低浓度下，Si_5–Q_5 处理的电导率明显大于 Si_0–Q_5 与 Si_2–Q_5 处理；而在较高浓度，发现 Si_2–Q_5 与 Si_5–Q_5 处理的电导率相当且均大于 Si_0–Q_5 处理。推测季铵盐作用 9 h 后菌体已裂解到最大程度，此时大部分胞内物质已释放至胞外，并有微量被菌体吸收或被其他微生物分解。表明随着 PDMS 嵌段的增长、浓度的增加以及在一定时间范围内，在较低浓度下 Si_x–Q_5 对菌丝细胞膜都具有较明显的破坏效果，随着浓度的增加，嵌段长度的增效作用逐渐减弱。

2.3 Si_x–Q_5 对 *R. solani* 细胞膜脂质过氧化的影响

生物体中，自由基与脂质发生脂质过氧化作用的最终产物为 MDA。由于 MDA 是一种水溶性分子，在细胞膜受到破坏会外泄，故可通过测定 MDA 含量来确定其细胞膜过氧化程度，从而确定细胞膜的损坏程度[18-19]。在正常细胞中，脂质过氧化反应与氧自由基反应处于动态平衡，当受到外界刺激（紫外线、高温、严寒、高盐等）时，氧自由基逐渐增加，即发生氧化应激。在氧化应激条件下，产生脂质过氧化产物（如 MDA），从而改变细胞膜的流动性等，导致细胞膜的结构与功能发生变化[20]。因此，可能是由于大分子季铵盐的阳离子密度高，使得脂质过氧化反应与氧自由基反应的动态平衡被打破，产生氧化应激，从而发生了脂质过氧化作用。

利用 MDA 试剂盒，检测 *R. solani* 菌丝与培养液的 MDA 含量，结果见图 5。由图 5 可知，对照组菌丝与培养液 MDA 含量均趋于 0，处理组菌丝与培养液 MDA 含量则随着药物的浓度升高而



小写英文字母不同者表示处理间差异显著

Different lowercase letters among treaments represent significant difference

图 5　Si_x–Q_5 处理对 *R. solani* 菌丝细胞膜脂质过氧化的影响

Fig. 5　Effect of Si_x–Q_5 treatment on lipid peroxidation on *R. solani* mycelial cell membrane

增加。在培养液中，经过 Si_0–Q_5 与 Si_2–Q_5 处理的 MDA 含量稍大于经过 Si_5–Q_5 处理的 MDA 含量；而在菌丝提取液中，经过 Si_0–Q_5 与 Si_5–Q_5 处理的 MDA 含量随浓度的增加有较小幅度的增加，而在经过 Si_2–Q_5 处理后，随着浓度的增加 MDA 含量增加较多。表明经过 Si_x–Q_5 处理后，菌丝细胞膜发生了脂质过氧化反应，由于菌丝细胞膜破裂，脂质过氧化的最终产物 MDA 渗漏于培养液中。且随着 PDMS 嵌段的不同，Si_x–Q_5 对于细胞膜的脂质过氧化影响也不同，其影响与 Si_x–Q_5 的嵌段结构有关。

3 讨论

位于细胞壁内侧的细胞膜主要由类脂物质和蛋白质构成，是富有弹性的半透性薄膜，是菌体细胞的选择性渗透屏障。当细胞膜损伤时，通透性增强，细胞质中的重要物质向外泄露，导致菌体死亡。前人研究发现，一些抗真菌剂（如新农抗 702、新型农抗 N2 提取物、纳他霉素等）就是通过损伤菌体细胞膜，造成细胞内含物外泄，从而起到杀菌作用[21-22]。

本试验结果表明，Si_x–Q_5 处理 *R. solani* 菌丝后，菌丝细胞膜完整性受到损害，胞内蛋白质、碳水化合物以及电解质发生外泄，尤其是随着药物浓度的提高，菌丝以及培养液中的 MDA 含量升高。表明大分子季铵盐打破了氧化自由基反应与脂质过氧化反应的平衡，发生了脂质过氧化作用，产生的 MDA 改变了细胞膜的结构和功能。细胞的脂质过氧化反应以及氧自由基反应对生物有机体新陈代谢具有重要作用，细胞经过高盐刺激后，打破了脂质过氧化反应与氧自由基反应的平衡，产生氧化应激，造成脂质过氧化，产生脂质过氧化产物 MDA[18]。我们在前期研究中发现，小分子季铵盐不会引起水稻纹枯病菌细胞膜发生脂质过氧化，是否引起细胞膜发生脂质过氧化反应是 Si_x–Q_5 与小分子季铵盐抑制水稻纹枯病菌在细胞膜这个作用靶点的重要区别。未来将通过研究两亲性大分子季铵盐 Si_x–Q_5 对 *R. solani* 菌丝细胞膜麦角甾醇生物合成、活性氧（ROS）以及谷胱甘肽等的影响，来进一步揭示 Si_x–Q_5 对水稻纹枯病菌的抑菌机理。

4 结论

3 种具有不同聚硅氧烷嵌段长度的 Si_x–Q_5（即 Si_0–Q_5、Si_2–Q_5 和 Si_5–Q_5）对水稻纹枯病菌菌丝细胞膜的完整性、渗透性以及脂质过氧化反应均产生了一定的影响，破坏了菌丝细胞膜的完整性，改变了细胞膜的渗透性以及促进了细胞膜的脂质过氧化反应，从而使得细胞膜的结构和功能发生变化；并且在一定时间范围内，随着 PDMS 嵌段的增长、处理时间的增加以及季铵盐浓度的提高，其对菌丝细胞膜的影响也更加显著。通过以上研究，初步确定了细胞膜是 Si_x–Q_5 抑制水稻纹枯病菌一个作用靶点，为 Si_x–Q_5 类大分子季铵盐的结构优化及其在水稻纹枯病防治中的应用提供一定的理论指导。

参考文献（References）：

[1] 于国辉 . 水稻纹枯病抗性遗传分析[D]. 武汉 : 华中农业大学, 2009.
YU G H. Genetic analysis of rice sheath blight resistance[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2009.

[2] 夏炜 . 新型杀菌剂对水稻纹枯病菌的毒力及混配剂开发[D]. 南京 : 南京农业大学, 2013.
XIA W. Activity of different fungicides against *Rhizoctonia solania* causing rice sheath blight[D]. Najing: Najing Agricultural University, 2013.

[3] 周荣金, 秦健, 杨茂英, 袁高庆, 黎起秦, 廖庭, 林纬 . 巨大芽孢杆菌 B196 菌株分泌的 Iturin A2 对水稻纹枯病的防治作用[J]. 广东农业科学, 2014, 41(4): 96–99. doi:10/16768/j.issn.1004–874X.2014.04.015.
ZHOU R J, QIN J, YANG M Y, YUAN G Q, LI Q Q, LIAO T, LIN W. Control effect of Iturin A2 produced by *Bacillus megaterium* B196 on rice sheath blight[J]. *Guangdong Agricultural Science*, 2014, 41(4): 96–99. doi:10/16768/j.issn.1004–874X.2014.04.015.

[4] 吴婕 . 四川省水稻纹枯病菌对井冈霉素抗药性监测[J]. 西南农业学报, 2015, 28(6): 2501–2504. doi: 10.16213/j.cnki.scjas.2015.06.029.
WU J.
Monitoring of resistance of *Thenatephorus cucumeris* to Jinggangmysin in Sichuan[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2015, 28(6): 2501–2504. doi:10.16213/j.cnki.scjas.2015.06.029.

[5] 李俊, 张勇杰, 李运玲, 宋永波 . 季铵盐杀菌剂的现状与发展趋势[J]. 日用化学品科学, 2015, 38(9): 32–35. doi:10.13222/ j.cnki.dc.2015.09.009.
LI J, ZHANG Y J, LI Y L, SONG Y B. Current status and development trend of quaternary ammonium bactericides[J]. *Journal of Basic Chemicals*, 2015, 38(9): 32–35. doi:10.13222/j.cnki.dc.2015.09.009.

[6] KANAZAWA A, IKEDA T, ENDO T. Novel polycationic biocides: Synthesis and antibacterial[J]. *Polycationic Biocides*, 1993, 31: 335–343. doi:10.1002/pola.1993.080310205.

[7] 刘杨润琦 . 聚硅氧烷季铵盐对香蕉枯萎病菌的抑菌机理[D]. 广州 : 华南农业大学, 2017.

LIUYANG R Q. Antibacterial mechanism of polysiloxane quaternary ammonium salt against banana fusarium wilt[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2017.

[8] 刘琼琼. 高分子季铵盐的合成、表征及其对细菌和真菌的抑制特性研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2014.
LIU Q Q. Synthesis, characterization and inhibition of bacteria and fungi on quaternary ammonium salts[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2014.

[9] LEI Y F, ZHOU S W, DONG C Y. PDMS tri-block copolymers bearing quaternary ammonium salts for epidermalantimicrobial agents: Synthesis, surface adsorption and non-skin-penetration[J]. *Reactive and Functional Polymers*, 2018, 124: 20-28. doi:10.1016/j.reactfunctpolym.2018.01.007.

[10] 佟会, 邱树毅. 季铵盐类抗菌剂及其应用研究进展[J]. 贵州化工, 2006, 31(5): 1-7.
TONG H, QIU S Y. Research progress of quaternary ammonium antibacterial agents and their applications[J]. *Journal of Guizhou Chemical Industry*, 2006, 31(5): 1-7.

[11] HUANG Z F, LIUYANG R Q, DONG C Y, LEI Y F, ZHANG A Q, LIN Y L. Polymeric quaternary ammonium salt activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense race 4: Synthesis, structure-activity relationship and mode of action[J]. *Reactive & Functional Polymers*,2017, 114: 13-22. doi:org/10.1016/j.reactfunctpolym.2017.02.013.

[12] LIN Y L, ZHONG W Q, DONG C Y, ZHANG C, FENG X X, ZHANG A Q. Synthesis and antifungal activities of amphiphilic PDMS-b-QPDMAEMA copolymers on *Rhizoctonia solani*[J]. *ACS Applied Bio Materials*, 2018, 1(6): 2062-2072. doi:10.1021/acsabm.8b00545.

[13] LIN Y L, LIU Q Q, CHENG L J. Synthesis and antimicrobial activities of polysiloxane-containing quaternary ammonium salts on bacteria and phytopathogenic fungi[J]. *Reactive & Functional Polymers*, 2014, 85: 36-44. doi:10.1016/j.reactfunctpolym.2014.10.002.

[14] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248-254. doi:10.1006/abio.1976.9999.

[15] MORRIS D L. Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood' santhrone reagent[J]. *Science*, 1948, 107: 254-255. doi:10.1126/science.107.2775.254.

[16] CAI J, CHEN J, LU G. Control of brown rot on jujube and peach fruits by trisodium phosphate[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2015, 99: 93-98. doi:10.1016/j.postharvbio.2014.08.003.

[17] LEWIS J A, PAPAVIZAS G C. Permeability changes in hyphae of *Rhizoctonia solani* induced by germling preparations of Trichoderma and Gliocladium[J]. *Phytopathology*, 1987, 77: 699-703. doi:10.1094/Phyto-77-699.

[18] SINGH V, PAL A, DAROKAR, MAHENDRA P. A polyphenolic flavonoid glabridin: oxidative stress response in multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2015, 87: 48-57. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.016.

[19] LEE H, HWANG J, LEE D G. Scolopendin 2 lead to cellular stress response in *Candida albicans*[J]. *Apoptosis*, 2016, 21(7): 856-865. doi:10.1007/s10495-016-1254-1.

[20] GEORGIOU C D, PATSOUKIS N, PAPAPOSTOLOU I. Sclerotial metamorphosis in filamentous fungi is induced by oxidative stress[J]. *Integrative and Comparative Biology*, 2006, 46(6): 691-712. doi:10.2307/3884863.

[21] 魏赛金. 链霉菌 702 对水稻的防病潜能和防病机制[D]. 南昌: 江西农业大学, 2013.
WEI S J. The disease prevention potential and mechanism of Streptomyces 702 on rice[D]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University, 2013.

[22] 吴志明, 钟敏, 鹿承建, 刘鹏, 占昭宏, 邵开生, 李昆太. 新型农抗 N2 粗提物对水稻纹枯病菌细胞膜和抗氧化功能的影响[J]. 核农学报, 2018, 32(4): 700-707. doi:10.11869/j.issn.100-8551.2018.04.0700.
WU Z M, ZHONG M, LU C J, LIU P, ZHAN Z H, SHAO K S, LI K T. Effects of the crude extract from *Streptomyces* sp. N2 on cell membrane and antioxidant function of *Rhizoctonia solani*[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Science*, 2018, 32(4): 700-707.

（责任编辑　杨贤智）