

齐中强, 薛延丰, 张 猛, 等. 蛇床子素对稻瘟病菌侵染的影响[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(6): 1265-1269.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2015.06.011

蛇床子素对稻瘟病菌侵染的影响

齐中强^{1,2}, 薛延丰¹, 张 猛¹, 李丽娜¹, 石志琦¹

(1.江苏省农业科学院食品质量安全与检测研究所, 江苏 南京 210014; 2.江苏省农业科学院植物保护研究所, 江苏 南京 210014)

摘要: 为了探究蛇床子素对稻瘟病菌致病力的影响, 采用生长速率和致病力测定的方法对其进行研究。室内生长速率测定结果表明, 蛇床子素对稻瘟病菌的生长有抑制作用, 32 $\mu\text{g/ml}$ 浓度下, 菌丝生长开始受到抑制, 160 $\mu\text{g/ml}$ 浓度下, 抑制率达到 65% 左右; 且液体培养状态下, 抑制作用更加明显。扫描电镜观察发现, 60 $\mu\text{g/ml}$ 蛇床子素处理条件下, 菌丝呈现畸形, 菌丝表面出现干瘪及皱缩, 部分菌丝出现断裂等现象。致病性试验结果表明, 20 $\mu\text{g/ml}$ 蛇床子素可降低稻瘟病菌对水稻的致病力, 40 $\mu\text{g/ml}$ 蛇床子素可完全抑制稻瘟病菌的侵染; 同时附着胞形成试验发现, 20 $\mu\text{g/ml}$ 蛇床子素能够部分抑制附着胞的形成, 40 $\mu\text{g/ml}$ 蛇床子素则能完全抑制孢子的萌发。

关键词: 蛇床子素; 稻瘟病菌; 附着胞; 细胞壁完整性

中图分类号: **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)06-1265-05

Effect of osthon on the invasion of *Magnaporthe oryzae*

QI Zhong-qiang^{1,2}, XUE Yan-feng¹, ZHANG Meng¹, LI Li-na¹, SHI Zhi-qi¹

(1. Institute of Food Safety, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: The influence of osthon on the pathogenicity of *Magnaporthe oryzae* was studied by detecting the growth rate and morphology of mycelia. The colony growth was inhibited when treated with 32 $\mu\text{g/ml}$ osthon and the inhibition rate was about 65% when treated with 160 $\mu\text{g/ml}$ osthon. The scanning electron microscope revealed clear morphological alteration (abnormality, widening and fracture) of mycelia of *M. oryzae* with 60 $\mu\text{g/ml}$ osthon treatment. The pathogenicity was reduced by the application of 20 $\mu\text{g/ml}$ osthon, and was totally lost with 40 $\mu\text{g/ml}$ osthon. Appressorium formation was partially inhibited with 20 $\mu\text{g/ml}$ osthon and the conidia could not germinate at all with 40 $\mu\text{g/ml}$ osthon.

Key words: osthon; *Magnaporthe oryzae*; appressorium; cell wall integrity

由稻瘟病菌 (*Magnaporthe oryzae*) 引起的稻瘟病是水稻生产上的重要病害之一, 在全世界稻区均有发生。且稻瘟病菌在水稻的整个生育期均能

侵染, 严重威胁世界粮食安全^[1-2]。防治稻瘟病最有效的措施是选育和利用抗病品种, 但由于稻瘟病菌的高度易变性, 抗病品种种植 3~5 年后, 就降低甚至丧失对稻瘟病的抗性^[3-4], 因此, 化学防治仍然是防治稻瘟病的关键措施之一。目前中国的防治药剂主要以春雷霉素、稻瘟灵以及三环唑为主, 由于药剂使用较为单一, 稻瘟病菌容易对上述药剂产生抗药性, 并且存在农药残留等安全隐患。因此研究和开发安全、高效、经济的新药剂尤为

收稿日期: 2015-08-04

基金项目: 江苏省青年基金项目 (BK20140749)

作者简介: 齐中强 (1986-), 男, 河南驻马店人, 博士, 助理研究员, 主要从事稻瘟病菌功能基因研究。(Tel) 025-84391810; (E-mail) 2006@126.com

通讯作者: 石志琦, (Tel) 025-84391863; (E-mail) shizhiqi@jaas.ac.cn

重要。

天然化合物蛇床子素是伞形科植物蛇床子 [*Cnidium monnieri* (L.) Cuss.] 的主要成分,属于香豆素类化合物,它对植物病原菌具有广泛的抑制作用^[5],但其对稻瘟病是否具有防效以及对稻瘟病菌的抑制作用如何等还未有报道。本研究主要从蛇床子素对稻瘟病菌致病力,附着胞形成和菌丝生长的抑制等方面进行研究,为开发新型、安全、优良防效的植物源农药提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

稻瘟病菌 (*Magnaporthe oryzae*) Guy11 由南京农业大学植物保护学院真菌与卵菌实验室提供。

蛇床子素 (纯度 99.5%,购自中国药品生物制品检定所)用无水乙醇配制成浓度为 $2 \times 10^4 \mu\text{g/ml}$ 后置 4℃ 冰箱保存。使用前用 ddH₂O 稀释成不同浓度。

水稻为感病品种 CO39,由南京农业大学植物保护学院真菌与卵菌实验室提供。

培养基为 CM (完全培养基),SDC (产孢培养基)^[6]。

1.2 试验方法

1.2.1 菌丝干质量测定 从 CM 培养基上生长 5~7 d 的菌落边缘使用直径 1 cm 的打孔器切取菌丝块,每块菌丝块平分为 4 小块置于含有不同浓度蛇床子素的每瓶 60 ml 液体 CM 培养基中,每瓶 12 小块。28℃,150 r/min,黑暗培养 48 h。培养结束后,过滤并用吸水纸压干,置于 2 ml EP 管中,冷冻抽干,称质量。每次试验设置 3 个重复。

1.2.2 菌丝直径测定 从 CM 培养基上生长 5~7 d 的菌落边缘上切取 3 mm×3 mm 的菌丝块,接种于直径 60 mm 的含有不同浓度蛇床子素的 CM 平板中央,28℃ 黑暗培养 7 d 后测量菌落直径并拍照。每次试验设 3 个重复,结果取平均值。

1.2.3 分生孢子形成测定 将野生型 Guy11 接种在 SDC 培养基上,28℃ 黑暗培养 7 d 左右,待菌丝体长满平板后,用手术刀将表面气生菌丝刮掉,于黑光灯下照射 3 d,诱导分生孢子产生。收集孢子时,向培养基内加入 3 ml 无菌水,轻轻用 1.5 ml EP 管底部将表面气生菌丝和孢子刷下,然后经过四层擦镜纸过滤收集孢子。

1.2.4 附着胞形成测定 将盖玻片 (Fisherbrand, 12-540-A 18×18-2) 放置在载玻片上 (下面滴加无菌水),取 40 μl 浓度为每 1 ml 5×10^4 个的分生孢子液 (含有不同浓度蛇床子素),滴加于盖玻片中央,随后将载玻片放入培养皿中 28℃ 黑暗保湿培养 4 h、8 h 和 24 h 后分别制片观测附着胞形成率,并拍照。每次试验设置 3 个重复。

1.2.5 水稻点滴致病性测定 将刷下的孢子调至浓度为 1 ml 5×10^4 个,剪取生长 14 d 的水稻叶片铺于含有保湿滤纸的培养皿中,每张叶片上点滴孢子液 3 个,以点滴清水为对照,置于 28℃ 黑暗培养 24 h,期间需要保持高温高湿状态,接种 5~7 d 后,观察结果并拍照。每次试验设置 3 个重复。

2 结果与分析

2.1 蛇床子素对稻瘟病菌生长的影响

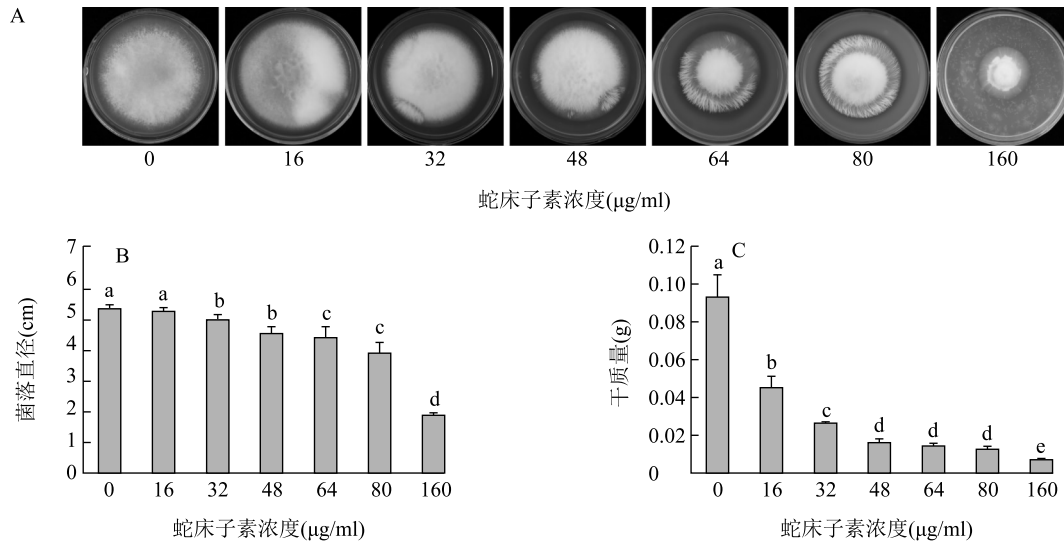
为了研究蛇床子素对稻瘟病菌 Guy11 的抑制作用,试验选取了含有不同浓度的蛇床子素的 CM 培养基,对 Guy11 的生长速率及干质量进行测定。图 1A 和图 1B 表明,蛇床子素浓度为 32 $\mu\text{g/ml}$ 时, Guy11 生长受到明显抑制,当蛇床子素浓度增加到 160 $\mu\text{g/ml}$ 时,抑制率达到约 65%。同时,检测了蛇床子素各浓度梯度下 Guy11 的干质量变化,结果如图 1C 所示, Guy11 在液体培养条件下对蛇床子素较为敏感,蛇床子素浓度为 16 $\mu\text{g/ml}$ 时,生长受到抑制,随着蛇床子素浓度的提高, Guy11 干质量逐渐下降,蛇床子素浓度为 160 $\mu\text{g/ml}$ 时, Guy 11 基本不生长。上述结果表明,蛇床子素对稻瘟病菌生长具有明显的抑制作用,且液体培养条件下,抑制作用更为显著。

2.2 蛇床子素对稻瘟病菌菌丝的影响

扫描电镜观察结果表明正常的稻瘟病菌菌丝饱满,表面平滑,经 60 $\mu\text{g/ml}$ 蛇床子素处理后菌丝表面出现干瘪及皱缩,部分菌丝甚至出现断裂等现象 (图 2)。

2.3 蛇床子素对稻瘟病发生的影响

图 3 表明,添加不同浓度蛇床子素与稻瘟病菌 Guy11 分生孢子悬浮液混合接种水稻时,20 $\mu\text{g/ml}$ 蛇床子素即可降低稻瘟病菌对水稻的致病力,当蛇床子素浓度增加到 40 $\mu\text{g/ml}$,可以完全抑制稻瘟斑的产生。同时,如图 4 所示,先滴加不含蛇床子素的孢子悬浮液 8 h 和 24 h 后,滴加 50 $\mu\text{g/ml}$ 蛇床子



A: 平板试验观察; B: 菌落直径统计分析; C: 干质量统计分析。不同小写字母表示各处理间差异显著。

图1 蛇床子素对稻瘟病菌生长的影响

Fig.1 The growth of Guy11 of *Magnaporthe oryza* exposed to different concentrations of osthol

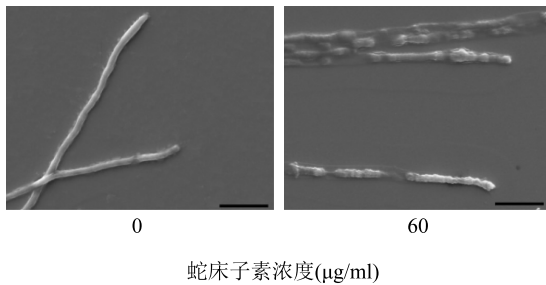


图2 蛇床子素对稻瘟病菌菌丝形态的影响

Fig.2 Hyphae morphogenesis of Guy11 exposed to osthol

素,结果发现蛇床子素均对稻瘟病的发生产生抑制作用。

2.4 蛇床子素对稻瘟病菌附着胞形成的影响

为了探究蛇床子素对稻瘟病菌侵染抑制作用的原因,分析了蛇床子素是否影响稻瘟病菌附着胞的形成。由图5可知,在蛇床子素浓度为20 µg/ml浓度时,培养4 h和8 h稻瘟病菌孢子均不能产生附着胞,只能萌发产生芽管;表1显示培养24 h后能够观察到附着胞,但形成率显著下降仅为50%左右,且形成的附着胞较对照变小,芽管变短,对照附着胞形成率接近100%。随着蛇床子素浓度的提高(40 µg/ml、60 µg/ml),稻瘟病菌孢子的萌发被完全抑制。上述结果表明蛇床子素能够抑制稻瘟病菌孢子萌发及附着胞的形成。

3 讨论

蛇床子素长期以来被应用于医药上,近几年来,其在抑制植物病原真菌方面的研究正在逐步展开。严清平等^[7]发现60 µg/ml蛇床子素在处理草莓白粉菌24 h后完全抑制其分生孢子萌发,80~125 µg/ml蛇床子素对该病原菌引起的病害防效达68.7%~79.5%;王春梅等^[8]发现25 µg/ml、20 µg/ml、16.7 µg/ml蛇床子素对黄瓜白粉病在第3次施药后7 d防效达97.73%以上。夏礼如等^[9]发现1%蛇床子素水乳剂对黄瓜霜霉病具有良好防效,但持效期较对照差。沈国涛等^[10]报道蛇床子素对小麦赤霉病菌可能的作用机制是抑制小麦赤霉病菌对葡萄糖、钙的吸收及ATP酶的活性。

分生孢子在稻瘟病菌的致病过程中具有重要作用^[11]。本研究发现蛇床子素对稻瘟病菌生长及孢子萌发具有抑制作用,尤其对孢子萌发的抑制更为显著,40 µg/ml浓度的蛇床子素处理稻瘟病菌分生孢子即可抑制其萌发且完全抑制稻瘟病斑的产生。本研究结果表明蛇床子素对稻瘟病发生的抑制主要作用于稻瘟病菌的孢子萌发及附着胞形成过程,而且较低浓度下即可达到较好效果。此外,本研究还发现在接种稻瘟病菌孢子8 h和24 h后接种50 µg/ml蛇床子素仍然对稻瘟病的发生具有一定抑制

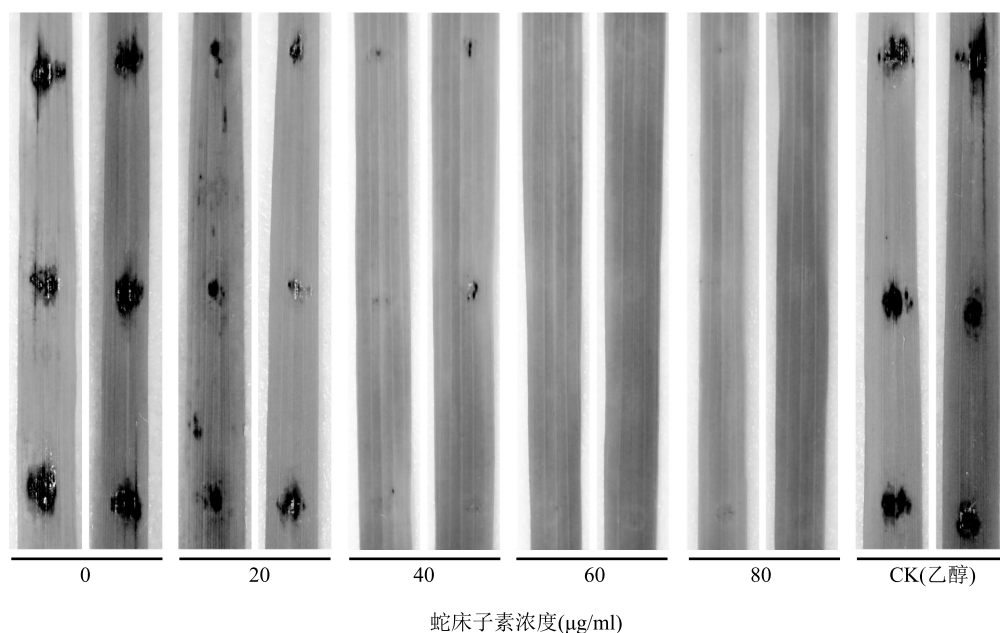


图 3 蛇床子素对稻瘟病菌 Guy11 侵染的影响

Fig.3 Inhibition of osthol against Guy11

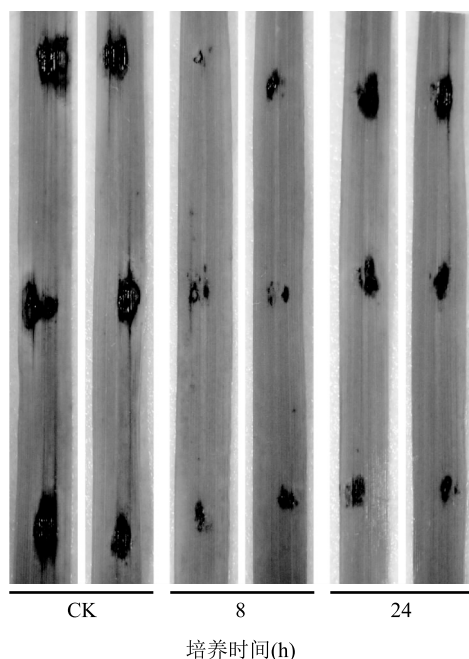


图 4 蛇床子素 (50 µg/ml) 对稻瘟病的治疗作用

Fig.4 Inhibition of osthol against Guy 11 after 8 h and 24 h

作用。文献报道稻瘟病菌接种 8 h 附着胞基本形成, 24 h 已经成熟, 并且开始侵入水稻, 因此蛇床子素可能对稻瘟病菌的侵入及扩展也具有影响^[12]。

对稻瘟病菌生长抑制试验可知, 32 µg/ml 浓度

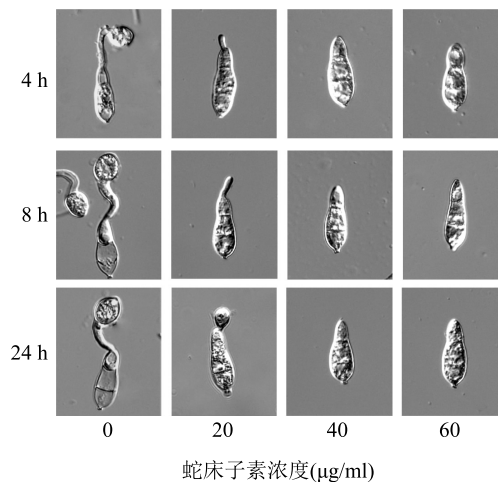


图 5 蛇床子素对稻瘟病菌孢子萌发及附着胞形成的影响

Fig.5 Effects of osthol on conidium germination and appressorium formation

蛇床子素处理下, 菌丝生长开始受到影响; 160 µg/ml 浓度蛇床子素处理下, 生长基本被抑制, 且液体培养条件下, 抑制作用更为明显。通过扫描电镜观察发现, 经 60 µg/ml 蛇床子素处理的菌丝呈现畸形, 菌丝表面出现干瘪及皱缩, 部分菌丝出现断裂等现象。由此推测蛇床子素破坏了稻瘟病菌菌丝细胞壁的完整性。真菌细胞壁完整性对维持其菌丝形态和对外界环境的适应发挥着关键作用^[13]。石志琦

表 1 蛇床子素对稻瘟病菌附着胞形成的抑制作用

Table 1 Inhibition of osthol against appressorium formation

蛇床子素浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	附着胞形成率(%)		
	培养 4 h	培养 8 h	培养 24 h
0	94.33 \pm 2.10	95.67 \pm 3.05	98.33 \pm 0.57
20	0	0	55.00 \pm 2.00
40	0	0	0
60	0	0	0

等^[14]以 100 $\mu\text{g/ml}$ 蛇床子素处理液体培养小麦赤霉病菌,同样发现菌丝大量断裂。因此推测菌丝断裂现象发生的原因是菌丝中几丁质水解酶经蛇床子素处理后,活性升高,使得合成细胞壁的几丁质前体水解,从而造成细胞壁出现断裂,严重影响细胞壁完整性。除此之外,稻瘟病菌在侵染后期,侵染菌丝在水稻细胞中大量扩展,但一定浓度的蛇床子素对菌丝生长具有抑制作用,因此蛇床子素能够抑制侵染菌丝的扩展,这也解释了蛇床子素为什么具有一定的治疗作用。

综上所述,蛇床子素对稻瘟病菌的抑制作用主要通过破坏菌丝体细胞完整性,影响其对营养成分的吸收及耐胁迫能力;其次,通过抑制分生孢子萌发及附着胞形成影响稻瘟病菌对水稻的致病力。蛇床子素抑制分生孢子萌发及附着胞形成的机制,蛇床子素的可能靶标以及蛇床子素是否诱发水稻的免疫反应等问题还有待进一步研究。

参考文献:

[1] TALBOT N J. On the trail of a cereal killer: exploring the biology of *Magnaporthe grisea* [J]. *Annu Rev Microbiol*, 2003, 57: 177-202.

[2] 张其蓉,宋发菊,田进山,等. 长江中下游稻区水稻区域试验品种抗稻瘟病鉴定与评价[J]. *江苏农业科学*, 2013, 41(4): 90-91.

[3] 刘永锋,陈志谊,刘卹洲,等. 2001-2010 年江苏省稻瘟病菌种群变化分析[J]. *江苏农业学报*, 2010, 26(1): 1233-1237.

[4] 唐成,陈露,安敏敏,等. 稻瘟病诱导水稻幼苗叶片氧化还原系统的特征谱变化[J]. *江苏农业科学*, 2014, 42(12): 141-144.

[5] QI Z, WANG Q, DOU X, et al. MoSwi6, an APSES family transcription factor, interacts with MoMps1 and is required for hyphal and conidial morphogenesis, appressorial function and pathogenicity of *Magnaporthe oryzae* [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2012, 13: 677-689.

[6] 石志琦,陈浩. 新型植物源创制农药蛇床子素[J]. *世界农药*, 2010, 32(6): 52-54.

[7] 严清平,陆信仁,夏礼如,等. 天然化合物蛇床子素防治草莓白粉病[J]. *农药*, 2005, 44(3): 136-137.

[8] 王春梅,吴桂本,王英姿,等. 蛇床子素防治黄瓜白粉病研究[J]. *江苏农业科学*, 2005(4): 57-58.

[9] 夏礼如,王永霞,程玲娟,等. 蛇床子素水乳剂对黄瓜霜霉病的防治效果[J]. *江苏农业科学*, 2009(6): 161-162.

[10] 沈国涛,石志琦,徐朗莱,等. 蛇床子素对小麦赤霉病菌葡萄糖、钙吸收和三磷酸腺苷酶活性的抑制[J]. *农药学报*, 2005, 7(2): 135-139.

[11] TALBOT N J, EBBOLE D J, HAMER J E. Identification and characterization of MPG1, a gene involved in pathogenicity from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* [J]. *The Plant Cell*, 1993, 5: 1575-1590.

[12] THINES E, WEBER R W, TALBOT N J. MAP kinase and protein kinase a-dependent mobilization of triacylglycerol and glycogen during appressorium turgor generation by *Magnaporthe grisea* [J]. *Plant Cell*, 2000, 12: 1703-1718.

[13] PRASAD R, KAPOOR K. Multidrug resistance in yeast *Candida* [J]. *Inter Rev Cytol*, 2005, 242: 215-248.

[14] 石志琦,沈国涛,徐朗莱,等. 蛇床子素对植物病原真菌抑制机制的初步研究[J]. *农药学报*, 2004, 6(2): 28-32.

(责任编辑:陈海霞)