

杀菌剂羟菌唑对油菜菌核病菌 生长发育的影响*

张新春, 康振生, 韩青梅, 景 岚, 黄丽丽

(西北农林科技大学 植保学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 用电子显微镜技术和细胞化学技术, 研究了羟菌唑对油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)生长发育的影响。扫描电镜观察发现, 药剂处理后病菌菌丝生长明显受到抑制, 菌丝粗细不均匀, 呈不规则肿大或缢缩, 分枝明显增多。超微结构研究表明, 药剂处理后, 病菌菌丝细胞壁不规则加厚, 以菌丝顶端细胞壁加厚尤为明显, 并有大量电子致密度高的物质存在; 与对照菌丝相比, 病菌菌丝隔膜肿大、畸形, 发育受阻; 有的菌丝体内有新菌丝产生, 且染色较深。细胞化学标记分析结果表明, 药剂处理后, 病菌菌丝细胞壁的 β 1, 3-葡聚糖和几丁质的标记密度明显高于对照菌丝, 说明药剂处理后, 这2种成分在细胞壁内显著增加。病菌菌丝细胞壁成分的变化表明, 羟菌唑影响了病菌细胞结构及其功能。

[关键词] 油菜菌核病; 羟菌唑; 超微结构; β 1, 3-葡聚糖; 几丁质

[中图分类号] S435 654

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)02-0025-06

油菜菌核病是由油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de bary)引起的一种世界性病害, 在世界各油菜生产国均造成严重减产^[1], 在我国长江流域和西南地区危害更为严重^[1~6], 减产达73%。由于目前尚未发现免疫和高抗油菜品种, 所以对油菜菌核病仍以化学药剂防治为主。目前虽有很多药剂用于防治, 如扑海因、速可灵等^[7~8], 但防效不很理想。羟菌唑是一种新型三唑类低毒高效的内吸杀菌剂, 有很强的保护和治疗作用, 其商品名称为Caramba, 化学名称为(1R S, 5R S: 1R S, 5SR)-5-(4-氯苯基)-2, 2-二甲基-1-(1-氢-1, 2, 4-三唑-1-甲基)环戊醇, 属于脱甲基抑制剂(demethylation Inhibitors DMIs)类, 是合成麦角甾醇前体的抑制剂^[9], 国外报道此药剂在田间对油菜菌核病有良好防治效果^[10]。许多研究已证实, 三唑类杀菌剂能引起多种植物病原真菌超微结构发生变化^[11~14], 但关于羟菌唑对油菜菌核病菌的作用机理目前尚无报道。因此, 本试验就其对油菜菌核病菌生长发育的影响及作用机理进行了研究。

1 材料与方法

1.1 菌种及其培养

供试菌种为采自西北农林科技大学农场自然发

病油菜病株上的菌核, 经培养、纯化得到纯培养, 4℃下保存于PDA平板上, 待用。

1.2 供试药剂及其质量浓度

供试药剂为羟菌唑乳油, 由德国Cyanamid Agrar公司生产, 含羟菌唑60 g/L。将羟菌唑乳油用蒸馏水稀释至有效浓度为30 00, 3 00, 0 30, 0 03 μ g/mL备用。

1.3 杀菌剂对菌丝生长的影响

在无菌条件下, 用直径5 mm的打孔器从生长4 d的菌落边缘切取等量菌饼, 将单个菌饼置于PDA培养基平板中心, 培养1 d后, 用等量灭菌滤纸条(1 cm×6 cm)分别蘸取各个质量浓度药液后, 放入菌落四周, 以四周放入蘸取无菌水滤纸条的菌落为对照。每个处理设3个重复, 置于25℃、无光照条件下培养, 以后每隔24 h测其菌落直径1次, 共测3次, 按下面公式计算抑制率, 并用F检验法进行差异显著性分析。同时沿菌落边缘切取一小块菌饼, 作为电镜样品进行加工。

$$\text{抑制率}/\% = \frac{\text{对照菌落直径} - \text{处理菌落直径}}{\text{对照菌落直径}} \times 100\%$$

1.4 扫描电镜样品的制备

样品的处理按康振生^[15]的方法进行: 样品用体

* [收稿日期] 2003-03-06

[基金项目] 国家杰出青年基金项目(30125031); 陕西省科技攻关项目(2001K02-G4)

[作者简介] 张新春(1972-), 女, 河南平顶山人, 在读硕士, 主要从事植物免疫学和油菜菌核病的研究。

[通讯作者] 康振生(1957-), 男, 四川安岳人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事病原物与寄主植物互作关系的细胞学和分子细胞学研究。

积分数 3% 戊二醛室温下固定 4~6 h, 磷酸缓冲液 (pH 6.8) 冲洗 6 次, 每次间隔 30 min, 后经系列丙酮 (体积分数为 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 100%) 脱水, 每次 30 min, 其中 100% 丙酮脱水 3 次, 纯醋酸异戊酯置换 2 次, 每次 30 min, CO₂ 临界点干燥, 粘样、镀膜后在扫描电镜下观察。

1.5 透射电子显微镜样品的制备

样品的固定采用戊二醛- 锇酸双重固定法^[15]。样品于体积分数 3% 戊二醛中前固定 3~6 h (4 °C), 用 pH 6.8 磷酸缓冲液反复冲洗 4~6 次, 每次间隔 20~30 min, 经体积分数 1% 锇酸固定 2 h (4 °C), 后经系列乙醇 (体积分数 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 100%) 梯度脱水, 每次 30 min, 其中 100% 乙醇脱水 3 次。用 LR white 树胶包埋, 60 °C 下聚合 2 d, 聚合后的样品用钻石刀切片, 超薄切片经醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色后, 于透射电镜下观察。

1.6 菌丝细胞壁中几丁质的细胞化学标记

真菌细胞壁中的几丁质定位采用凝集素- 胶体金探针法^[16]。麦芽凝集素- 胶体金购于 Sigma 公司。几丁质的标记采用液滴漂浮法于室温下进行^[17]。超薄切片在含 0.5% 牛血清蛋白的磷酸缓冲液生理盐液 (PBS 10 mol/L, pH 7.2) 中漂浮封闭 20 min, 然后在麦芽凝集素- 胶体金液 (1:30 的 PBS 缓冲液) 中漂浮孵育 2 h, 经 PBS 和蒸馏水冲洗后,

再用醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色, 即可用于观察。

1.7 菌丝细胞壁中 β 1, 3-葡聚糖的免疫细胞化学标记

标记使用小鼠抗 β 1, 3-葡聚糖的单克隆抗体^[18] (购于 Biosupplies Australia Pty. Ltd 公司)。切片先在含有 1% 牛血清蛋白的 PBS 缓冲液上漂浮封闭 20 min, 然后在含有单克隆抗体 (1:50) 的 PBS 缓冲液中漂浮孵育 2 h, 随后切片再经 PBS 缓冲液冲洗, 用羊抗鼠免疫球蛋白- 胶体金 (1:30, 15 nm, 购于英国 Biocell 公司) 的 PBS 溶液孵育 1 h, 经醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色后用于观察。

2 结果与分析

2.1 羟菌唑对菌丝生长的影响

皿内抑菌试验结果 (表 1) 表明, 羟菌唑对病菌菌丝生长有明显抑制作用, 表现为药效快、抑制率高。施药后 24 h, 在质量浓度为 3.0 μ g/mL 时, 对菌丝生长的抑制率已达 68.4%, 此后随作用时间延长, 同一质量浓度药剂对菌丝生长的抑制作用越来越明显, 至施药后 72 h, 药剂在所有供试质量浓度下均能显著抑制菌丝生长, 在质量浓度为 0.3 μ g/mL 时, 药剂对菌丝生长的抑制率达 51.7%, 而建议使用质量浓度 (3.0 μ g/mL) 此时的抑制率已达 88.3%, 说明该药剂对菌丝生长抑制效果很显著。

表 1 不同质量浓度羟菌唑对油菜菌核病菌菌丝生长的影响

Table 1 Effect of different Caramba concentration on hyphal growth of *Sclerotinia sclerotiorum*

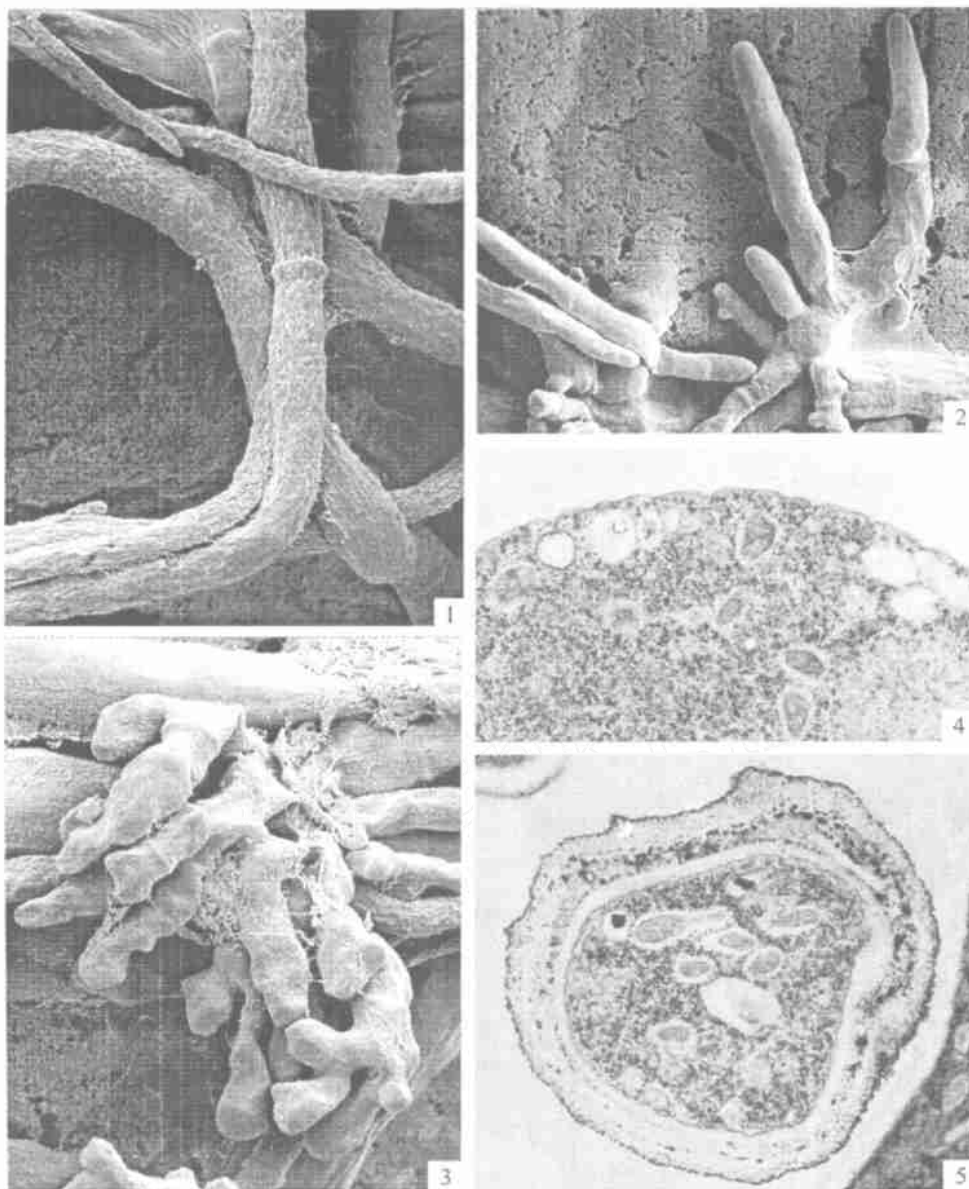
羟菌唑 质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) Concentration	药剂处理时间/h The hours after treatment							F 检验 F test	
	0		24		48		72		
	菌落直径/cm Colony diameter	菌落直径/cm Colony diameter	抑制率/% Inhibition rate	菌落直径/cm Colony diameter	抑制率/% Inhibition rate	菌落直径/cm Colony diameter	抑制率/% Inhibition rate		
30.00	0.9	1.4	73.7	1.4	88.1	1.4	91.7	A	
3.00	0.8	1.4	68.4	1.5	83.3	1.5	88.3	A	
0.30	0.8	2.3	21.1	3.4	38.1	3.5	51.7	B	
0.03	0.6	2.4	5.3	4.3	11.9	5.5	18.3	C	
CK	0.6	2.5	0	4.8	0	6.6	0	D	

2.2 羟菌唑对菌丝形态与结构的影响

扫描电镜观察发现, 在 PDA 培养基上正常生长的油菜菌核病菌菌丝粗细均匀, 表面光滑、纤长, 菌丝顶端尖细 (图版 I-1)。但在药剂处理后, 菌丝形态发生异常变化, 表现为菌丝畸形、粗细不均匀、不规则地缢缩和膨大 (图版 I-2)。与对照相比, 菌丝分枝明显增多, 甚至还有多次分枝, 但分枝较短且粗细不均, 顶端变钝圆或膨大 (图版 I-3)。

透射电镜观察表明, 未经药剂处理的菌丝细胞

壁厚度均匀 (图版 I-4), 而经药剂处理后的菌丝细胞壁呈现不规则加厚 (图版 I-5, 图版 II-1), 菌丝顶端部位细胞壁加厚更为明显。对菌丝隔膜的观察发现, 药剂处理后隔膜两侧发育不对称, 并发生畸形、肿大 (图版 II-2)。经药剂处理后, 发现菌丝内有新菌丝产生 (图版 I-5, 图版 II-1), 且菌丝细胞外围常常可观察到染色较深的物质, 这可能是菌丝受药剂作用后, 体内代谢失衡而引起了细胞内物质的渗漏。



图版 I 羟菌唑对油菜菌核病菌菌丝形态与结构影响的扫描(1~3)和透射(4,5)电镜照片

1 未经药剂处理的对照菌丝, 菌丝平滑, 分枝正常, 顶端尖细。2 药剂处理后的菌丝, 菌丝不规则膨大、缢缩, 分枝增多。3 药剂处理后菌丝, 菌丝过度分枝, 分枝顶端钝圆或膨大。4 未经药剂处理的对照菌丝, 菌丝细胞壁厚薄均匀。5 药剂处理后的菌丝细胞, 菌丝细胞不规则加厚, 电子致密度增高

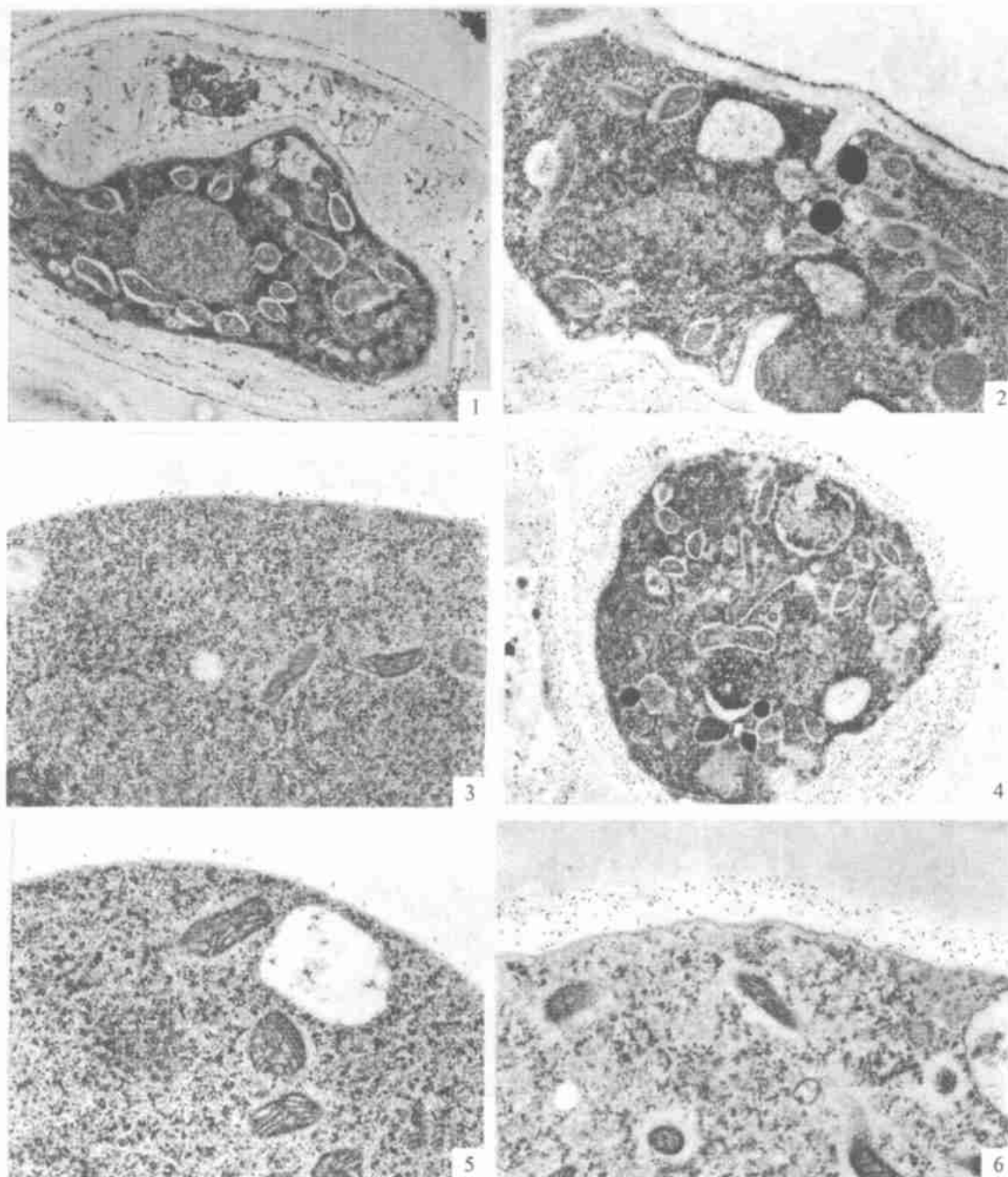
Plate I Scanning (1- 3) and transmission (4, 5) electron micrographs of the hyphae of *Sclerotinia sclerotiorum*, untreated and treated hyphae with the fungicide metconazole

1. Hypha from the untreated control The hyphae were even The tip of the hyphae is slim. The hyphae branching occurred at some distance from the hyphal tip. 2. Hyphae treated with the fungicide The hyphae were inconsistent, swollen irregularly and with more branches 3. Hyphae treated with the fungicide Excessive branching occurred and the tip of hyphae was swollen irregularly. 4. Hypha from the untreated control The hyphal cell walls were thin and uniform. 5. Hypha treated with the fungicide The hyphal cell wall was extremely thickened and became much dense

2.3 羟菌唑对菌丝细胞壁成分与组成的影响

2.3.1 菌丝细胞壁中几丁质的细胞化学标记 透射电镜观察发现, 未经药剂处理的菌丝经麦芽凝集素- 胶体金标记后, 胶体金特异性地沉积于细胞壁上, 细胞质和细胞器内均无胶体金颗粒分布(图版

II-3), 表明几丁质主要存在于细胞壁上。而经药剂处理的菌丝标记后, 细胞壁上大量沉积胶体金颗粒, 其颗粒密度远远高于对照菌丝(图版 II-4)), 表明药剂处理后病菌菌丝细胞壁内几丁质成分大量增加。



图版 II 羟菌唑对油菜菌核病菌菌丝结构(1, 2)和菌丝细胞壁成分(3~ 6)影响的电镜照片

1. 药剂处理后的菌丝, 原菌丝细胞内形成了又一菌丝。2. 药剂处理后的菌丝, 菌丝隔膜畸形。3. 未经药剂处理的对照菌丝, 经细胞化学标记, 几丁质被定位于菌丝细胞壁内。4. 药剂处理后的菌丝, 经细胞化学标记, 大量的几丁质被定位于增厚的菌丝细胞壁内。5. 未经药剂处理的对照菌丝, 经细胞化学标记, 葡聚糖被定位于菌丝细胞壁内。6. 药剂处理后的菌丝, 经细胞化学标记, 大量的葡聚糖被定位于增厚的菌丝细胞壁内。

Plate II Transmission electron micrographs of the hyphae of *Sclerotinia sclerotiorum*, treated hyphae with the fungicide metconazole (1, 2) and cytochemical localization of cell wall components in the hyphae (3- 6)

1. Hyphae treated with the fungicide A new hyphae is developed in the old hyphae 2 Hyphae treated with the fungicide The septum in the hyphae became swollen and malformed 3 Hyphae from the untreated control, incubated with wheat germ agglutinin-gold Chitin were localized in the cell wall of the hyphae 4 Hyphae treated with the fungicide, incubated with wheat germ agglutinin-gold Much chitin were localized in the thickened cell wall of the hyphae 5 Hyphae from the untreated control, incubated with antibody against β 1, 3-glucan and the secondary antibody-gold β 1, 3-glucan were localized in the cell wall of the hyphae 6 Hyphae treated with the fungicide, incubated with antibody against β 1, 3-glucan and the secondary antibody-gold Much β 1, 3-glucan were localized in the thickened cell wall of the hyphae

2.3.2 菌丝细胞壁中 β 1, 3-葡聚糖的免疫细胞化学标记 电镜观察发现, 超薄切片经 β 1, 3-葡聚糖抗体孵育和羊抗鼠免疫球蛋白-胶体金标记后, 未经药剂处理的对照菌丝上金颗粒均匀地沉积在细胞壁上, 而细胞质和细胞器上则没有观察到金颗粒存在(图版II-5), 表明 β 1, 3-葡聚糖主要存在于菌丝细胞壁上。但经药剂处理后的菌丝细胞壁上有大量金颗粒存在, 且金颗粒密度明显高于对照(图版II-6), 表明药剂处理后, 菌丝细胞壁中 β 1, 3-葡聚糖成分显著增加。

3 讨论

本研究应用电镜技术观察了新杀菌剂羟菌唑对油菜菌核病菌生长发育的影响, 发现羟菌唑能使病菌的形态、细胞结构及细胞化学成分发生很大变化: (1) 菌丝生长严重受到抑制, 粗细不均, 扭曲畸形, 呈现不规则的肿大和缢缩, 分枝过度增多, 末端膨大钝圆。(2) 菌丝细胞壁不规则加厚, 菌丝顶端细胞壁加厚尤为明显。隔膜发育受阻, 两侧发育不对称, 发生畸形, 肿大。(3) 有的菌丝细胞内还可产生新菌丝。(4) 在菌丝细胞的外围常常可以观察到一些染色较深的物质, 可能为细胞渗出物。(5) 免疫细胞化学定位标记结果显示, 经药剂处理的菌丝细胞壁中的几丁质和 β 1, 3-葡聚糖含量明显增多。以上观察结果为生产上应用羟菌唑防治油菜菌核病提供了理论依据。

Caramba 是一种三唑类化合物, 有效成分是羟

菌唑(M etconazole), 其对合成麦角甾醇前体具抑制作用, 属脱甲基抑制剂(demethylation inhibitors DM Is)。在甾醇前体合成过程中, 其通过其化学结构和理化性质抑制脱甲基步骤的完成, 从而抑制麦角甾醇的合成。由于麦角甾醇是构成生物细胞膜的主要成分, 其合成受阻将间接影响细胞膜的结构和功能。史建荣等^[19]研究表明, 小麦纹枯病菌经三唑酮处理后, 病菌细胞的麦角甾醇含量下降, 电解质渗漏增加。康振生等^[11~14]研究三唑类杀菌剂对小麦条锈菌、白粉菌、纹枯病菌、苹果黑星菌等的发育影响时观察到, 杀菌剂处理菌丝后, 菌丝细胞壁发生不规则增厚, 尤以菌丝顶端胞壁加厚最明显。本研究结果表明, 羟菌唑对油菜菌核病菌的作用可能同样是通过影响细胞质膜成分麦角甾醇的生物合成, 而间接影响质膜合成及质膜透性的, 从而导致胞内物质渗漏, 菌丝生长受抑。

几丁质和 β 1, 3-葡聚糖是真菌细胞壁的主要化学成分。在本研究中, 羟菌唑在使真菌细胞壁不规则加厚的同时, 还能使其胞壁成分发生改变。几丁质和 β 1, 3-葡聚糖的细胞化学标记结果显示, 经药剂处理的菌丝细胞壁中二者的金颗粒密度都明显高于对照菌丝。这可能是羟菌唑影响了病菌的正常生物代谢, 破坏了细胞膜的生物功能, 引起菌丝细胞壁的不规则加厚, 特别是菌丝顶端细胞壁的明显加厚, 以及几丁质和 β 1, 3-葡聚糖含量的增高。但是, 关于羟菌唑对该病原菌细胞质膜影响的生化机制及引起菌丝分枝增多的生理生化机理尚需进一步研究。

[参考文献]

- [1] 李丽丽 世界油菜病害研究概述[J]. 中国油料, 1994, 16(1): 79- 81.
- [2] 杨庚周 淮北地区油菜菌核病的发病规律与防治方法[J]. 农业科技通讯, 1998, 27- 29.
- [3] 赵家定, 汤顺章, 唐淑菊 不同药剂防治油菜菌核病的效果[J]. 安徽农学通报, 2001, 7(1): 54- 55.
- [4] 万咏生 不同药剂及施药时间对油菜菌核病的防治效果[J]. 安徽农学通报, 1999, 5(4): 31- 32.
- [5] 赵 敏 油菜菌核病药剂防治试验[J]. 农药, 1998, 37(2): 34- 35.
- [6] 张信扬, 韩友珍, 李练军 油菜菌核病发生规律[J]. 贵州农业科学, 2000, 28(6): 35- 37.
- [7] Charles C R. The effects of the fungicide, iprodione on the Mycelium of *Sclerotinia sclerotiorum* [J]. Phytopathology, 1981, 71 (7): 722- 727.
- [8] Mueller D S. Efficacy of fungicides on sclerotinia stem rot on *Sclerotinia sclerotiorum* and their potential for control of *Sclerotinia* stem rot on soybean[J]. Plant Dis, 2002, 86(1): 26- 31.
- [9] Horst L. Modern selective fungicides Peoperties, Applications, Mechanisms of Action[M]. 2nd revised and enlarged edition. Austria: Gustev Fischer Verlag Jena, 1994.
- [10] Tiedemann A V, K Hedleund R M. Biologische Bek mpfung der Sclerotinia Weißtangeligkeit[J]. Fachzeitschrift über Fund Eiweißgglanzen, 2001, 32: 15- 19.
- [11] 黄丽丽, 康振生, 严勇敢, 等 甾醇生物合成抑制剂粉锈宁对苹果黑星病菌发育影响的研究[J]. 菌物系统, 2001, 20(2): 250- 257.
- [12] 康振生, 商鸿生, 井金学 内吸杀菌剂烯唑醇对小麦条锈菌和白粉菌发育影响的研究[J]. 植物病理学报, 1996, 26(2): 111- 116.

- [13] 陈汝梅, 李金玉, 康振生. 戊唑醇对小麦纹枯菌超微结构的影响[J]. 菌物系统, 2000, 19(3): 389- 395.
- [14] 康振生, 商鸿生, 李振歧. 三唑酮对小麦条锈菌在寄主内发育的影响[J]. 西北农业大学学报, 1993, 21(增 2): 14- 18.
- [15] 康振生. 植物病原菌超微结构[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1996.
- [16] Horisberger M, Rosset J. Colloidal gold, a useful marker for transmission and scanning electron microscopy[J]. J Histochem Cytochem, 1997, 25: 295- 305.
- [17] Kang Z, Huang L, Buchenauer H. Effects of tebuconazole on morphology structure, cell wall components and trichothecene production of *Fusarium culmorum* in vitro[J]. Pest Management Science, 2001, 57: 491- 500.
- [18] Meikle P J, Hoogenraad N J, Larke A E, et al. The location of (1, 3)- β glucans in the walls of pollen tubes of *Nicotiana glauca* using a (1, 3)- β glucan-specific monoclonal antibody[J]. Planta, 1991, 185: 1- 8.
- [19] 史建荣, 王裕中. 三唑酮三唑醇对小麦纹枯病菌形态和生理的影响[J]. 植物病理学报, 1992, 22(3): 205- 209.

Effects of fungicide metconazole on the hyphal development of *Sclerotinia sclerotiorum* on canola

ZHANG Xin-chun, KANG Zhen-sheng, HAN Qing-mei, JING Lan, HUANG Li-li

(College of Plant Protection, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The effects of metconazole, a systemic fungicide from the triazol group were examined on morphology, structure, cell wall components of *Sclerotinia sclerotiorum* by means of electron microscopy and immunocytochemical labelling techniques. The studies revealed that metconazole not only inhibited the hyphal growth, but also caused a series of marked morphological and structural alterations of hyphae. These changes included irregular swelling, excessive branching and many tumors on the surface of hyphae, considerable thickening of the hyphal cell walls, particularly at the hyphal tip region. The septum development of the hyphae was inhibited and became malformed. Using cytochemical techniques, the labelling densities of chitin and β 1, 3-glucan in the cell wall of the fungicide-treated hyphae were increased dramatically comparing with those of the untreated control hyphae, indicating that the detrimental effects of the fungicide on structure and function of the hyphal membranes resulted in the changes of the cell walls compositions.

Key words: *Sclerotinia sclerotiorum*; metconazole; ultrastructure; β 1, 3-glucan; chitin