

周 昊,徐寸发,齐中强,等. 不同胁迫因子对稻瘟病菌菌丝形态的影响[J]. 江苏农业科学,2015,43(12):150-152.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.12.045

不同胁迫因子对稻瘟病菌菌丝形态的影响

周 昊¹, 徐寸发¹, 齐中强², 徐为民¹

(1. 江苏省农业科学院中心实验室, 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:以含有红色荧光(细胞核)的稻瘟病菌菌株 Guy11-H1:RFP 为研究对象,利用激光共聚焦显微镜和扫描电子显微镜在 4 种胁迫条件下对其生长和菌丝形态进行研究。结果表明, Guy11-H1:RFP 在 4 种胁迫条件下生长变慢;在 KCl 处理下,菌丝局部不规则膨大,隔膜间距变短,菌丝塌陷;NaCl 处理下,菌丝呈现片段化,塌陷,且 2 种条件下,细胞核分布均受到影响。H₂O₂ 和 SDS 处理下,菌丝形态不受影响。

关键词:稻瘟病菌;胁迫;菌丝形态;KCl;NaCl;H₂O₂;SDS

中图分类号: S435.111.4⁺1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)12-0150-02

稻瘟病是由稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*)引起的水稻真菌性病害。该病害在全世界稻区均有发生,且在水稻的整个生育期均能侵染,严重威胁世界粮食安全生产,每年水稻由于稻瘟病造成的损失,约占总产量的 10%~30%^[1-2]。稻瘟病菌主要通过分生孢子进行侵染,能够在病斑上再次产生分生孢子,遇到适宜的温度和湿度,就会大面积暴发^[3]。防治稻瘟病主要采用化学防治和选育抗病品种等措施,但由于稻瘟病菌毒力变异高度频繁,抗病品种种植 5 年左右,就会降低甚至丧失对稻瘟病的抗性,抗病品种的选育面临很大挑战^[4]。我国主要以春雷霉素、稻瘟灵以及三环唑为防治稻瘟病的化学药剂,但由于药剂较为单一,稻瘟病菌很容易产生抗药性。

稻瘟病菌在生长发育及侵染循环过程中,要面临各种环境条件带来的压力。氧化压力作为寄主植物对病原菌的防卫反应措施之一,发挥着重要作用;细胞壁胁迫和渗透压胁迫经常用作药剂开发的设计靶标;氯化钾是钾肥的主要成分,能够促进植物的生长,提高抗逆水平。本研究主要针对 4 种胁迫条件对稻瘟病菌的生长及菌丝形态的影响,为综合防治稻瘟病提供新思路。

1 材料与方法

1.1 供试材料

稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*) Guy11-H1:RFP 由南京农业大学植物保护学院真菌与卵菌实验室提供。

十二烷基磺酸钠(SDS)购自上海生工(批号:A600485),氯化钠(NaCl)购自上海生工(批号:A610476),过氧化氢(H₂O₂)购自上海生工(批号:A501976),氯化钾(KCl)购自上海生工(批号:A610440)。活细胞转盘式高速激光共聚焦显微镜,厂家 PerkinElmer,型号 UltraVIEW;扫描电子显微镜

(SEM),厂家 Car Zeiss,型号 EVO LS10。

培养基为 CM(完全培养基)配方见文献[5]。

1.2 试验方法

1.2.1 待测菌丝样品制备 从 CM 培养基上生长 5~7 d 的 Guy11-H1:RFP 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,按 6 小块/瓶置于含有不同浓度待测试剂的 60 mL/瓶液体 CM 培养基中,在 28℃、150 r/min、黑暗的条件下摇培 48 h。培养结束后,用无菌水冲洗 3 次,拍照,待用。具体每种胁迫及浓度如下:0.50、0.75 mol/L KCl,0.25、0.50 mol/L NaCl,0.50、0.75 mmol/L H₂O₂,0.000 75%、0.001 5% SDS。

1.2.2 菌丝形态激光共聚焦显微观察 将上述准备好的菌丝放入无菌水中,用眼科镊撕取部分菌丝放到载玻片上,加水,盖片,置于活细胞转盘式高速激光共聚焦显微镜样品台,在油镜(60×)下拍摄菌丝 DIC 和菌丝细胞核分布图像,该菌丝细胞核能在激光(波长 561 nm)激发下发荧光。

1.2.3 菌丝形态电子显微观察 采用扫描电子显微镜观察菌丝表面形态,具体操作步骤如下:(1)清洗。磷酸缓冲液(2 mol/L)或纯水反复清洗样品表面的附着物。(2)固定。2%~3%戊二醛溶液固定,4℃过夜。(3)清洗。磷酸缓冲液或纯水清洗 3 次,每次 10 min。(4)脱水。50%、70%、80%、90%的乙醇梯度脱水各 15 min,100%乙醇脱水 3 次,每次 30 min,将样品附到盖玻片上。(5)干燥。临界点干燥仪干燥样品。(6)粘样。导电胶带或双面胶将盖玻片粘到样品台上。(7)镀膜。离子溅射仪给样品镀 10 nm 金膜。(8)上机。镀好金膜的样品放入扫描电子显微镜样品室,在 HV 模式下拍摄菌丝 SEM 图片。

2 结果与分析

2.1 不同胁迫因子对稻瘟病菌生长的影响

为了研究不同胁迫因子对稻瘟病菌的抑制作用,试验选取了细胞壁胁迫(SDS)、渗透压胁迫(NaCl)、盐离子胁迫(KCl)、氧化压力胁迫(H₂O₂) 4 种胁迫因子。通过液体摇培发现,每种处理下,稻瘟病菌菌丝球均变小,并呈现出随试剂浓度加大逐渐变小的趋势(图 1)。表明稻瘟病菌对 4 种胁迫

收稿日期:2015-10-15

作者简介:周 昊(1988—),男,江苏盐城人,研究实习员,主要从事仪器管理方面的研究,E-mail:707386854@qq.com。共同第一作者:徐寸发(1991—),男,江西瑞金人,硕士,研究实习员,从事仪器管理方面的研究,E-mail:jaasxueunfa@163.com。

通信作者:徐为民(1975—),男,江苏盐城人,副研究员,主要从事仪器管理方面的研究。E-mail:weimin0518@sina.com。

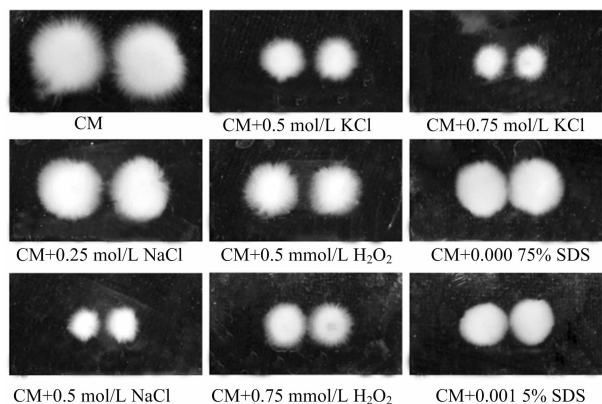


图1 不同胁迫因子对稻瘟病菌生长的影响

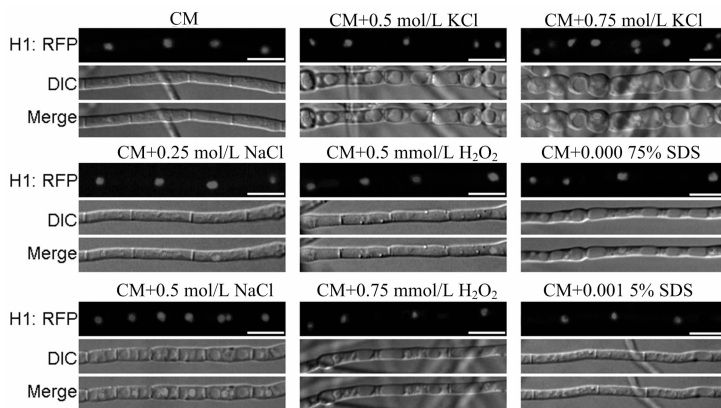


图2 不同胁迫因子对稻瘟病菌菌丝形态和细胞核分布的影响

2.3 电镜下观察不同胁迫因子对稻瘟病菌菌丝形态的影响

为了进一步明确上述胁迫因子对稻瘟病菌菌丝形态建成的影响,采用扫描电子显微镜进行观察。结果发现,KCl 处理下,菌丝局部呈现不规则膨胀,隔膜间距变短,0.75 mol/L KCl 下还出现菌丝塌陷现象(图3);NaCl 处理下,菌丝呈现片段化、塌陷现象,其余处理情况下,稻瘟病菌菌丝和不处理情况一致,菌丝表面均匀,光滑,隔膜间距较大(图3)。上述结果表明,盐离子和渗透压胁迫对稻瘟病菌菌丝具有一定破坏作用,其余2种胁迫基本没有影响。

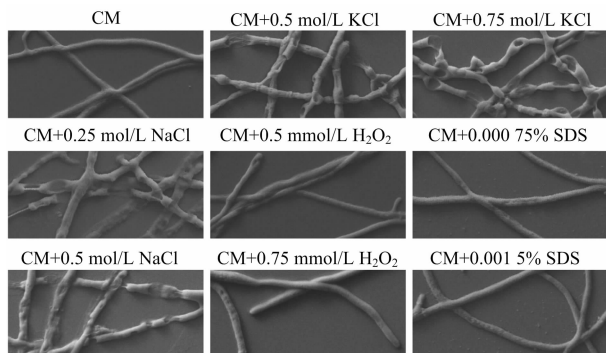


图3 不同胁迫因子对稻瘟病菌菌丝形态的影响

3 讨论与结论

真菌细胞壁对于维持细胞形态建成和调控对环境的耐力发挥着重要作用^[6],细胞壁的生物合成过程时常作为抗真菌化学药物作用靶点。稻瘟病作为危害水稻生产的一类主要真

菌敏感,生长变慢。此外,经过 SDS 处理可以看出,菌丝变得较为致密,其他处理条件下均无此现象。

2.2 不同胁迫因子对稻瘟病菌菌丝形态的影响

Guy11-H1:RFP 是一个转入 H1:RFP 融合蛋白的菌株,定位在细胞核中,在波长 561 nm 激发下显示红光。为了进一步探究上述胁迫因子对稻瘟病菌菌丝形态的影响,利用激光共聚焦显微镜对其菌丝形态及细胞核分布进行观察。结果发现,0.75 mol/L KCl 和 0.5 mol/L NaCl 处理条件下,隔膜增多,细胞核分布受到影响,单位长度菌丝中含有较多细胞核(图2)。KCl 处理下,菌丝体变得膨大,不规则(图2)。上述结果表明盐胁迫影响稻瘟病菌菌丝隔膜分布及形态,渗透压胁迫影响菌丝隔膜分布,其余2种胁迫对菌丝形态和细胞核分布没有影响。

菌病害,防治药剂主要是黑色素抑制剂三环唑类,并且具有优异表现^[7]。本研究通过4种胁迫因子对稻瘟病菌生长及菌丝形态的影响入手,发现细胞壁胁迫、渗透压胁迫、盐离子胁迫、上氧化压力胁迫对稻瘟病菌的生长均有一定抑制作用。通过激光共聚焦显微镜及电子显微镜发现氯化钾对稻瘟病菌菌丝影响较大,能够导致菌丝隔膜增多,菌丝体不规则膨大,菌丝塌陷等现象,表明稻瘟病菌菌丝对盐离子胁迫具有较强的敏感性。氯化钾作为钾肥可以促进植物的生长,提高抗倒伏能力,有文献报道施用钾肥可以有效降低茎腐病的发生^[8-9],进一步研究表明氯化钾并不能直接抑制玉米茎腐病原菌禾谷镰刀菌的生长,抑制玉米茎腐病发生的机制则更可能是施用氯化钾引起的玉米根基土壤微生物区系(真菌数目)的变化^[10]。本研究中,氯化钾能够抑制稻瘟病菌的生长,破坏菌丝形态建成,明显不同于禾谷镰刀菌,施用钾肥和防治稻瘟病之间具有什么关系值得进一步研究。

氯化钠处理条件下,稻瘟病菌菌丝多呈现片段化、塌陷现象,无规则膨大较少,表明渗透压胁迫对菌丝的作用不同于氯化钾。稻瘟病菌中,存在1条 Ssk2-Pbs2-Osm1 级联反应信号通路,调控稻瘟病菌的渗透压胁迫^[11]。酵母中,一类核酸合成相关基因缺失突变体 pyr5 同样对氯化钠敏感^[12]。同时,本研究也观察到0.5 mol/L NaCl 处理下,菌丝的细胞核分布变得紧密,这也验证了氯化钠对稻瘟病菌菌丝的影响可能通过核酸合成途径。此外,细胞壁胁迫 SDS 处理下,稻瘟病菌生长受到影响,菌丝变得致密,菌丝形态没有受到影响,推测可能是SDS的作用靶点不在细胞壁结构上。氧化压力胁

刘建凤,吉春明,苏建坤,等. 几种杀菌剂对黄瓜霜霉病菌室内毒力测定[J]. 江苏农业科学,2015,43(12):152-154.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.12.046

几种杀菌剂对黄瓜霜霉病菌室内毒力测定

刘建凤,吉春明,苏建坤,陆玉荣,张春梅,吕 敏,刘怀阿

(江苏里下河地区农业科学研究所,江苏扬州 225007)

摘要:采用黄瓜苗盆栽方法,进行了 6 种常用杀菌剂对黄瓜霜霉病菌的室内毒力测定,为田间防治黄瓜霜霉病选择药剂提供一定的参考。结果表明,50% 烯酰吗啉可湿性粉剂、25% 嘧菌酯悬浮剂、10% 多抗霉素可湿性粉剂、70% 丙森锌可湿性粉剂、75% 百菌清可湿性粉剂、80% 代森锰锌可湿性粉剂对黄瓜霜霉病的 EC_{50} 值分别为 5.943 9、6.237 9、9.382 8、12.736 4、13.108 8、16.413 7 mg/L。黄瓜霜霉病菌对 6 种常用杀菌剂的敏感性差异较大,其中 50% 烯酰吗啉可湿性粉剂对黄瓜霜霉病菌的毒力最强,其次为 25% 嘧菌酯可湿性粉剂。

关键词:杀菌剂;黄瓜霜霉病菌;毒力测定

中图分类号: S436.421.1⁺1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)12-0152-03

黄瓜是蔬菜生产中的主栽品种之一,黄瓜霜霉病(*Cucumber downy mildew*)是黄瓜生产上的重大病害,在黄瓜产区均有分布,春秋两季尤为严重,扬州地区也不例外。霜霉病的传播速度很快,流行性极强,在适宜条件下,无论是露天还是设施栽培,均受到霜霉病菌的浸染,苗期、成株期都可发病^[1]。黄瓜霜霉病主要危害黄瓜的叶片,通常下部的叶片先

受害,逐步向上蔓延扩展,初期病叶边缘或叶背面出现水渍斑,病斑扩大后受叶脉限制,呈多角形或四方形的黄褐色病斑,在潮湿的条件下,叶背面和叶面的病斑上长出灰黑色的霉层,后期病斑愈合成大斑或病斑破裂,致全叶枯黄卷缩,最后导致全株枯死,轻病株结果减少,果实畸形,品质低劣,给黄瓜生产造成严重的经济损失^[2]。病叶上产生的孢子囊主要通过气流、雨水、昆虫等传播,空气相对湿度在 85% 以上,气温在 10~25℃ 时最易受到霜霉病浸染,湿度越高,孢子囊产生越快,数量增多,病情趋于严重。选择的黄瓜品种抗性差、管理不善、年年重茬、土壤脱肥、浇水过多等都易导致黄瓜霜霉病严重发生^[3]。

黄瓜霜霉病的防治措施包括农业防治、物理防治、化学防治、生物防治等,但在生产上仍以化学防治为主。防治植物病

收稿日期:2015-07-02

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(14)2059];江苏省科技支撑计划(编号:BE2013385)。

作者简介:刘建凤(1968—),女,江苏兴化人,助理研究员,从事农作物病虫害防治工作。E-mail:yzljfeng@163.com。

通信作者:刘怀阿,副研究员,从事农作物病虫害防治研究。E-mail:13815824068@163.com。

迫条件下,稻瘟病菌也只是生长受到抑制,其余没有显著变化,推测可能是过氧化氢作为寄主防卫反应的武器,主要通过营养吸收等抑制病原菌的生长,与菌丝形态无关。

综上所述,稻瘟病菌对 4 种胁迫较为敏感,盐胁迫和渗透压胁迫对稻瘟病菌菌丝具有较大的破坏作用,而氧化压力胁迫和细胞壁胁迫对菌丝形态基本没有影响;此外,上述胁迫因子对稻瘟病菌影响的分子机制还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Talbot N J. On the trail of a cereal killer: exploring the biology of *Magnaporthe grisea* [J]. *Annual Review of Microbiology*, 2003, 57: 177-202.
- [2] Skamnioti P, Gurr S J. Against the grain: safeguarding rice from rice blast disease [J]. *Trends in Biotechnology*, 2009, 27(3): 141-150.
- [3] Wilson R A, Talbot N J. Under pressure: investigating the biology of plant infection by *Magnaporthe oryzae* [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2009, 7(3): 185-195.
- [4] 刘永锋,陈志道,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(6): 1233-1237.
- [5] 齐中强,杜 艳,刘永锋. Rho 型 GTPase 激活蛋白 MoBem2 在稻瘟病菌分生孢子形态建成中的功能[J]. *江苏农业学报*, 2015, 31

(5): 1001-1005.

- [6] Cabib E, Roh D H, Schmidt M, et al. The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(23): 19679-19682.
- [7] 郭晓莉,刘晓梅,高德泉,等. 水稻稻瘟病防治技术研究[J]. *吉林农业科学*, 2010, 35(6): 40-42.
- [8] 梅丽艳,郭 梅,李志勇. 钾肥防治玉米青枯病应用技术初步研究[J]. *植保技术与推广*, 2003, 23(6): 3-5.
- [9] 李 红,沙洪林,宋淑云,等. 应用足量钾肥和高效种衣剂防治玉米茎腐病的试验研究[J]. *吉林农业大学学报*, 2004, 26(4): 360-362.
- [10] 刘晓燕,金继运,何 萍,等. 氯化钾抑制玉米茎腐病发生与土壤微生物关系初探[J]. *植物营养与肥料学报*, 2007, 13(2): 279-285.
- [11] Li G T, Zhou X Y, Xu J R. Genetic control of infection-related development in *Magnaporthe oryzae* [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2012, 15(6): 678-684.
- [12] Yoshikawa K, Tanaka Tadamasu, Furusawa C, et al. Comprehensive phenotypic analysis for identification of genes affecting growth under ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *FEMS Yeast Research*, 2009, 9(1): 32-44.