

司洪阳,杜红,郝学政,等. 1.8% 嘧肽·多抗水剂对烟草靶斑病菌(*Rhizoctonia solani*)的作用机制研究[J]. 江苏农业科学,2018,46(2):67-69.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.02.018

1.8% 嘧肽·多抗水剂对烟草靶斑病菌 (*Rhizoctonia solani*)的作用机制研究

司洪阳,杜红,郝学政,赵秀香,吴元华

(沈阳农业大学植物保护学院,辽宁沈阳 110161)

摘要:采用菌丝生长速率等测定方法测定 5 种不同浓度的 1.8% 嘧肽·多抗水剂对烟草靶斑病菌菌丝生长的抑制效果,测量经药剂处理过的菌悬液的电导率,菌丝麦角甾醇、丙二醛的含量等。结果表明,45.00/90.00 mg/L 1.8% 嘧肽·多抗水剂可以完全抑制烟草靶斑病菌菌丝的生长;经 90.00 mg/L 1.8% 嘧肽·多抗处理过的菌丝出现畸形、原生质外渗、菌丝分枝不明显、菌丝断裂等现象;1.8% 嘧肽·多抗水剂在药剂浓度和处理时间上均能影响烟草靶斑病菌菌丝细胞膜的渗透性,药剂浓度越大、处理时间越长培养液中电导率越大;1.8% 嘧肽·多抗处理过的烟草靶斑病菌菌丝丙二醛的含量明显增加,表明病菌细胞膜受到破坏;1.8% 嘧肽·多抗水剂对烟草靶斑病菌菌丝中麦角甾醇的含量无明显影响。1.8% 嘧肽·多抗水剂对烟草靶斑病菌具有较好的抑制作用,该药剂对烟草靶斑病菌菌丝形态、细胞膜透性及细胞膜脂质过氧化程度均有一定的影响。

关键词:1.8% 嘧肽·多抗水剂;烟草靶斑病菌;抑菌方式;作用机制;电导率;麦角甾醇;丙二醛

中图分类号:S435.72 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)02-0067-03

嘧肽·多抗水剂是由生物农药嘧肽霉素^[1]和多抗霉素复配而成的新型农用抗生素,已获农药临时登记,其理化性质稳定,能够耐高温、酸碱和阳光照射,且无毒无害,对大多数植物真菌病害均有一定的防治作用。烟草靶斑病是近几年我国烟草上发现的一种新病害,主要由立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani* Kühn)引起^[2-3]。烟草靶斑病主要危害烟草叶片,在苗期至大田成熟期均可发生,一旦发生迅速蔓延,造成烟叶质量和产量降低^[4],已成为影响烟草产量和品质的重要病害之一。目前,尚未发现较好的抗病品种,药剂防治依然是控制烟草靶斑病的主要手段^[5]。本试验研究 1.8% 嘧肽·多抗水剂对烟草靶斑病菌的抑菌方式和作用机制,以期对烟草靶斑病的田间防治提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试病原菌为烟草靶斑病菌(*Rhizoctonia solani* Kühn),由沈阳农业大学植物保护学院提供。

供试药剂为 1.8% 嘧肽·多抗水剂,由沈阳红旗林药有限公司提供。

PDA 培养基:200 g 马铃薯、20 g 葡萄糖、18 g 琼脂粉、1 L 蒸馏水;PD 培养基:200 g 马铃薯、20 g 葡萄糖、1 L 蒸馏水。

供试试剂盒:真菌 DNA 提取试剂盒,购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 1.8% 嘧肽·多抗水剂对烟草靶斑病菌菌丝生长的抑制作用 采用含药培养基法测定烟草靶斑病菌的抑菌活性,将定量的 PDA 培养基加热融化,冷却至 45 ℃ 左右,分别加入不同浓度的 1.8% 嘧肽·多抗水剂,使其终浓度分别为 5.63、11.25、22.50、45.00、90.00 mg/L,并以不加药剂作为对照,充分混匀,倒入培养皿中,制成含药培养基。

用打孔器制取直径为 6 mm 的菌饼,将菌丝面朝下接种在 PDA 平板中间位置,每组设置 3 个重复,将培养皿放入 28 ℃ 恒温箱中培养,直至菌丝长满培养皿后,用十字交叉法测量菌落直径,并用下列公式计算出菌丝生长抑制率:

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

1.2.2 1.8% 嘧肽·多抗水剂对烟草靶斑病菌菌丝形态的影响 制备烟草靶斑病菌的菌丝悬浮液,移入含定量 PD 培养基的三角瓶中,置于 28 ℃ 摇床中振荡培养 24 h,然后加入一定量嘧肽·多抗水剂使其终浓度为 90.00 mg/L,并于药剂处理 4、8、12、16、24 h 后进行取样,在显微镜下观察菌丝的形态变化。

1.2.3 1.8% 嘧肽·多抗水剂对烟草靶斑病菌菌丝细胞膜渗透性的影响 将制备好的菌悬液倒入定量的 PD 培养基中,振荡培养 24 h,分别加入 1.8% 嘧肽·多抗水剂,使其终浓度为 11.25、45.00、90.00 mg/L,每个处理 3 次重复,并以不加药剂的处理作为对照。加入药剂后,立即取出 5 mL 培养液,用电导率仪测定其电导率,剩下的菌悬液继续振荡培养,分别于 4、8、12、20、24 h 后取出培养液,离心处理后留上清液测其电导率^[6]。

收稿日期:2017-05-07

基金项目:中国烟草总公司科技重大专项(编号:中烟办[2016]259号)。

作者简介:司洪阳(1994—),女,河南郑州人,硕士,主要从事烟草叶斑类病害生物防治研究。E-mail:875841647@qq.com。

通信作者:赵秀香,博士,副教授,主要从事烟草病害、蔬菜病害、植物病毒病及生物农药等相关研究。E-mail:zhaosx0772@163.com。

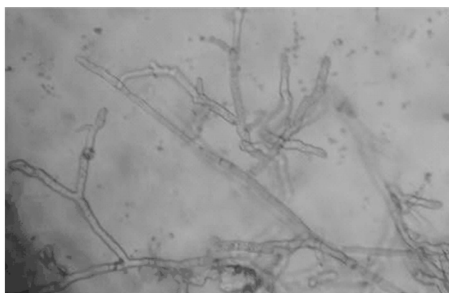
1.2.4 1.8% 嘧肽·多抗水剂对烟草靶斑病病菌菌丝麦角甾醇含量的影响 参考单慰曾等的方法^[7],制备菌丝悬浮液后倒入 PD 培养基中,振荡培养 48 h 后分别加入嘧肽·多抗药剂,使其终浓度分别为 1.25、22.50、45.00、90.00 mg/L,每个处理 3 次重复,并以不加药剂的处理作为对照。继续培养 48 h 后,用纱布过滤,磷酸缓冲液清洗各处理菌丝 3 次,取出后放入离心管中,6 000 r/min 离心收集菌丝体。各处理分别取 2.5 g 湿菌丝,加入甲醇和三氯甲烷(体积比为 2:1)混合液,研磨至匀浆后室温静置 1 h,依次加入水、三氯甲烷和磷酸缓冲液各 5 mL,待分层后取三氯甲烷相,水浴蒸干。加入甲醇和乙醇(体积比为 4:1)混合液,60 ℃ 皂化 1 h,加入水和石油醚各 4 mL,取石油醚层蒸干,用乙醇溶液溶解干物质,定容至 3 mL,用分光光度计在 282 nm 处测定其吸光度($D_{282\text{ nm}}$),由吸光度可求出菌丝麦角甾醇含量的变化(x),公式如下:

$$x = \frac{\text{对照 } D_{282\text{ nm}} - \text{处理 } D_{282\text{ nm}}}{\text{对照 } D_{282\text{ nm}}} \times 100\%。$$

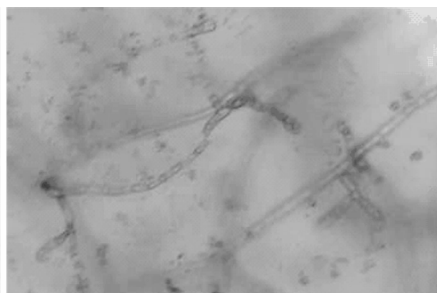
1.2.5 1.8% 嘧肽·多抗水剂对烟草靶斑病病菌菌丝脂质过氧化的影响 收集菌丝体的方法同“1.2.4”节,PD 液体培养基留存待用。称取 2.0 g 湿菌丝体,加液氮研磨至粉末状,加入 4 mL 巴比妥酸和三氯乙酸混合液(1.5 g 2-巯代巴比妥酸溶于 30 mL 三氯乙酸,蒸馏水定容至 150 mL),溶解菌丝体内产生的丙二醛,12 000 r/min 离心,取上清液转移到试管中,沸水处理使丙二醛与巴比妥酸产生显色反应。冰浴冷却后 12 000 r/min 再次离心,取上清液待测。同时,将液体培养基与巴比妥酸和三氯乙酸的混合液按体积比 5:2 混合,分别测定各处理样品在 450、532、600 nm 处的吸光度^[8],并按以下公式计算丙二醛(MDA)的浓度(C_{MDA}):

$$C_{\text{MDA}} = 6.45(D_{532\text{ nm}} - D_{600\text{ nm}}) - 0.56D_{450\text{ nm}}。$$

1.2.6 1.8% 嘧肽·多抗水剂对烟草靶斑病病菌菌丝 DNA 合成的影响 取各浓度嘧肽·多抗药剂处理后的菌丝,用滤纸吸干菌丝表面的水分,然后放入烘箱中,温度设置为 40~50 ℃,每 5 min 观察 1 次,当菌丝水分蒸干即可取出;加入液氮研磨,磨碎成粉末后,倒入离心管中,使菌丝量在离心管 0.5 mL 刻度处。菌丝准备完毕后,采用真菌 DNA 提取试剂盒提取 DNA,按照试剂盒具体步骤进行操作,最后将提取到的 DNA 收集到离心管中,测定 DNA 含量。



a. 经 90.00 mg/L 1.8% 嘧肽·多抗水剂处理的菌丝



b. 未经药剂处理的菌丝

图2 1.8% 嘧肽·多抗水剂对烟草靶斑病病菌菌丝形态的影响

2.3 1.8% 嘧肽·多抗对烟草靶斑病病菌菌丝细胞膜渗透性的影响

电导率是病原菌菌丝细胞膜破坏程度的指标,电导率数值越大,说明细胞膜透性越大,细胞膜的破坏程度越严重。由

2 结果与分析

2.1 1.8% 嘧肽·多抗水剂对烟草靶斑病病菌菌丝生长的抑制作用

由图 1 可知,1.8% 嘧肽·多抗水剂处理过的培养基中,随着药剂浓度的增大,病原菌菌落直径不断减小,菌丝生长也较为稀疏。经 22.50~90.00 mg/L 1.8% 嘧肽·多抗水剂处理后,烟草靶斑病病菌菌丝不能正常生长,抑制率可达 100%,经 11.25、5.63 mg/L 嘧肽·多抗处理后,烟草靶斑病病菌菌丝略有生长,但菌落颜色较浅,5.63 mg/L 1.8% 嘧肽·多抗水剂对菌丝生长的抑制率达 40%。结果表明,1.8% 嘧肽·多抗水剂对烟草靶斑病病菌菌丝表现出较强的抑制作用。

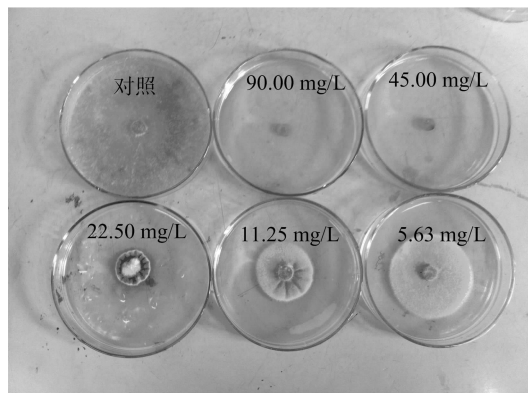


图1 1.8%嘧肽·多抗水剂对烟草靶斑病病菌菌丝生长的抑制作用

2.2 1.8% 嘧肽·多抗水剂对烟草靶斑病病菌菌丝形态的影响

经 90.00 mg/L 1.8% 嘧肽·多抗水剂处理 4 h 后,菌丝开始发生变化,部分菌丝原生质凝聚并收缩(图 2-a),8 h 后菌丝出现畸形,原生质大量外渗,菌丝分枝不明显,菌丝断裂情况加重;而对照菌丝生长旺盛,未见原生质外渗,伸展力强,菌丝分隔明显(图 2-b)。结果表明,1.8% 嘧肽·多抗水剂可以通过破坏烟草靶斑病病菌的菌丝而达到抑制菌丝生长的作用。

图 3 可知,在一定范围内,随着处理时间的延长和 1.8% 嘧肽·多抗水剂浓度的增加均会使电导率变大。加入药剂后立即取出培养液进行测定,不同浓度的 1.8% 嘧肽·多抗水剂药剂处理的菌丝与对照菌丝差异不明显,电导率在 1.41~

1.45 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 之间;随着处理时间的延长,各浓度处理的电导率均明显增加,高浓度处理的电导率明显比低浓度处理的电导率高,电导率增加的幅度从 20 h 后变化不明显,由此推测,此时病原真菌菌丝细胞膜已被完全破坏。

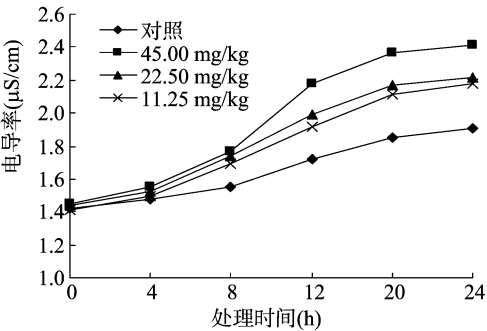


图3 1.8%噻肽·多抗水剂对烟草靶斑病病菌细胞膜透性的影响

2.4 1.8%噻肽·多抗对烟草靶斑病病菌菌丝麦角甾醇含量的影响

麦角甾醇是真菌细胞膜的重要组分,它在确保膜结构的完整性、膜结合酶的活性、膜的流动性、细胞活力及物质运输等方面起着重要作用。试验结果表明,在对照培养液中生长的烟草靶斑病病菌菌丝麦角甾醇含量与加入不同浓度 1.8%噻肽·多抗药剂的培养液中培养的菌丝麦角甾醇含量差别不大,由此可知,1.8%噻肽·多抗水剂对烟草靶斑病病菌菌丝中麦角甾醇的含量无明显影响。

2.5 1.8%噻肽·多抗水剂对烟草靶斑病病菌菌丝脂质过氧化的影响

丙二醛是膜质过氧化的产物,可表示脂质过氧化的程度,反映出膜损坏的程度。由表 1 可知,在对照处理中,丙二醛的总浓度为 0.088 7 $\mu\text{mol}/\text{L}$,经过浓度为 11.25 mg/L 的 1.8%噻肽·多抗水剂处理后丙二醛的总浓度为 0.132 5 $\mu\text{mol}/\text{L}$,且随着 1.8%噻肽·多抗水剂浓度的增加,烟草靶斑病病菌菌丝体内丙二醛的含量逐渐升高,即细胞膜脂质过氧化的程度加剧。

表1 不同浓度 1.8%噻肽·多抗水剂对烟草靶斑病病菌菌丝丙二醛(MDA)的影响

1.8%噻肽·多抗水剂浓度(mg/L)	菌丝体内 MDA 浓度($\mu\text{mol}/\text{L}$)	培养基内 MDA 浓度($\mu\text{mol}/\text{L}$)	MDA 总浓度($\mu\text{mol}/\text{L}$)
45.00	0.260 0	0.092 2	0.176 1
22.50	0.206 0	0.072 6	0.139 3
11.25	0.193 3	0.071 6	0.132 5
对照	0.105 9	0.071 5	0.088 7

2.6 1.8%噻肽·多抗水剂对烟草靶斑病病菌菌丝 DNA 合成的影响

由表 2 可知,经 45.00、22.50、11.25 mg/L 1.8%噻肽·多抗水剂处理的烟草靶斑病病菌菌丝 DNA 的含量有明显变化。在 45.00 mg/L 1.8%噻肽·多抗水剂处理的情况下,DNA 合成抑制率为 54.20%;在 22.50 mg/L 1.8%噻肽·多抗水剂处理的情况下,DNA 合成抑制率为 46.35%;在 11.25 mg/L 1.8%噻肽·多抗水剂处理的情况下,DNA 合成

抑制率为 34.12%。由此可知,1.8%噻肽·多抗水剂可以在 DNA 水平上抑制菌丝生长。

表2 不同浓度 1.8%噻肽·多抗水剂对烟草靶斑病病菌菌丝 DNA 含量的影响

1.8%噻肽·多抗水剂浓度(mg/L)	DNA 含量($\text{ng}/\mu\text{L}$)	DNA 合成抑制率(%)
45.00	25.1	54.20
22.50	29.4	46.35
11.25	36.1	34.12
对照	54.8	

3 结论与讨论

本研究的结果表明,1.8%噻肽·多抗水剂对烟草靶斑病病菌具有良好的抑制作用,45.00 mg/L 1.8%噻肽·多抗水剂能够有效抑制烟草靶斑病病菌菌丝生长,抑制率达到 100%;5.63 mg/L 1.8%噻肽·多抗对菌丝生长的抑制率也可达 40%;同时,烟草靶斑病病菌经过 1.8%噻肽·多抗处理后,菌丝出现畸形,原生质大量外渗,菌丝分枝不明显,菌丝断裂。1.8%噻肽·多抗能够使烟草靶斑病病菌菌丝体电解质外渗,影响细胞膜透性的变化,且对烟草靶斑病病菌菌丝在相同处理时间内,随着 1.8%噻肽·多抗水剂浓度的增加,电导率逐渐升高;在同一处理浓度下,在一定范围内处理时间越长,电导率越大,对细胞膜的破坏程度越严重。1.8%噻肽·多抗水剂对烟草靶斑病病菌菌丝细胞膜麦角甾醇含量无明显影响,但能够使细胞膜脂质过氧化,释放出丙二醛,且 1.8%噻肽·多抗水剂的浓度越大,丙二醛的含量越高。1.8%噻肽·多抗水剂能够抑制烟草靶斑病病菌菌丝 DNA 的合成,45.00 mg/L 1.8%噻肽·多抗水剂对烟草靶斑病病菌菌丝 DNA 合成的抑制率为 54.20%,11.25 mg/L 1.8%噻肽·多抗水剂对烟草靶斑病病菌菌丝 DNA 合成的抑制率为 34.12%。

参考文献:

[1] 吴元华,杜春梅,朱春玉,等. 新型农抗噻肽霉素研究进展[J]. 云南农业大学学报,2003,18(4):135-136.
[2] 吴元华,王左斌,刘志恒,等. 我国烟草新病害——靶斑病[J]. 中国烟草学报,2006,12(6):22,插1.
[3] 吴元华,赵艳琴,赵秀香,等. 烟草靶斑病原鉴定及生物学特性研究[J]. 沈阳农业大学学报,2012,43(5):521-527.
[4] 王潮钟,黄 霁,董 雪,等. 防治烟草靶斑病药剂的筛选[J]. 河南农业科学,2016,45(1):92-95.
[5] 刘斯泓,纪明山. 防治烟草靶斑病的复配药剂配方筛选及田间药效试验[J]. 江苏农业科学,2014,39(6):140-143.
[6] 丁锦平. 不同有毒介质对棉花黄萎病菌细胞膜渗透性的影响[J]. 河南农业科学,2013,42(6):88-90,94.
[7] 单慰曾,陆 斌,徐 霞,等. 紫外光谱检测香菇液体和固体菌丝麦角甾醇[J]. 植物生理学通讯,1989(2):67-70.
[8] 王春梅,张 杰,陈 浩,等. 天然化合物丁香酚对灰葡萄孢菌丝脂质过氧化和膜损伤的影响[J]. 农药学报,2009,11(1):104-108.