

· 研究论文 ·

蛇床子素对南瓜白粉病菌侵染的影响

李彩霞^{1,2}, 周威², 纪明山¹, 石志琦^{*2}

(1. 沈阳农业大学 植物保护学院, 沈阳 110161;

2. 江苏省农科院 食品质量安全与检测研究所, 南京 210014)

摘要:采用室内离体叶片法,发现蛇床子素(osthol)处理能显著降低南瓜白粉病菌侵染的病情指数,接菌6 d后对照的病情指数为68.89,经100 μg/mL蛇床子素处理组的病情指数仅为15.56。显微观察发现蛇床子素可有效降低南瓜白粉病菌对寄主的入侵,并可有效抑制菌丝的生长。接菌后48 h,对照菌丝的平均长度接近400 μm,蛇床子素处理组菌丝平均长度仅有122 μm。苯胺蓝染色后显微观察发现蛇床子素还可降低白粉病菌的产孢量。

关键词:蛇床子素;南瓜白粉病菌;侵染

中图分类号: S482.292

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2007)01-0049-05

Effect of Osthol on the Invasion of *Sphaerotheca fuliginea*

LI Cai-xia^{1,2}, ZHOU Wei², JI Ming-shan¹, SHI Zhi-qi^{*2}

(1. College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China;

2. Institute of Food Safety, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: The effect of osthol on the development of *Sphaerotheca fuliginea* was studied by detached leaves. The results showed that 6 days after inoculation, the disease index was 68.89 in the control, while that was only 15.56 in the treatment with osthol at 100 μg/mL. The number of interaction sites with H₂O₂ accumulation was strongly decreased in the leaves treated with osthol. Osthol also depressed the growth of mycelia. The average colony length was about 400 μm in the control, while that was only 122 μm in the treatment with 100 μg/mL osthol. Osthol could also depress conidiation of powdery mildew.

Key words: osthol; *Sphaerotheca fuliginea*; interaction sites

由南瓜白粉病菌 *Sphaerotheca fuliginea* 引起的瓜类白粉病是世界性植物病害,目前已对6类杀菌剂——苯并咪唑类、麦角甾醇生物合成抑制剂(EBIs)、有机磷类、羟基嘧啶类、甲氧基丙烯酸酯类和苯氧基喹啉类产生了抗药性,且抗性发展速度惊人^[1~4]。因此,研究和开发对瓜类白粉病有效

的新型杀菌剂具有重要的意义。

蛇床子素(osthol)是伞形花科植物蛇床子 *Cnidium monnieri* (L.) Cuss 的主要成分,属于香豆素类化合物,近年来发现其对植物病原真菌具有显著的抑制作用^[5],但其对白粉病菌的作用方式,如对分生孢子侵染率、菌丝生长、产孢量的影

收稿日期: 2006-10-31; 修回日期: 2007-01-14.

作者简介: 李彩霞(1978-),女,硕士研究生。*通讯作者: 石志琦(1966-),女,研究员,从事天然化合物在农产品安全中的应用研究。联系电话: 025-84391863; E-mail: shizhiqi@jaas.ac.cn

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划)(2006AA10A209); 国家自然科学基金(30471125)。

响等尚未见报道。作者采用苯胺蓝和 DAB 染色法研究了蛇床子素对南瓜白粉病菌在寄主上侵染发病过程的影响,旨在为蛇床子素防治由植物病原真菌引起的病害提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

99.5% 蛇床子素 (osthol) 原药购自中国药品生物制品检定所,用乙醇配制成 $2.0 \times 10^4 \mu\text{g/mL}$ 蛇床子素母液,使用前用蒸馏水配制成不同浓度溶液。二氨基联苯胺 (3,4-diaminobenzidine, DAB 4HCl) 用蒸馏水配成浓度为 1 mg/mL 的水溶液^[6,7]。按文献 [8,9] 方法配制体积分数为 0.5% 的苯胺蓝乳酸酚染液 (乳酸 甘油 蒸馏水 = 1 2 1, 体积比)。

南瓜品种为日本南瓜 *Cucurbita moschata* Duch., 高度感病品种。

南瓜白粉病菌 *Sphaerotheca fuliginea* 采自田间自然发病的南瓜植株上,于温室条件下在日本南瓜上重新接种繁殖后备用。

1.2 处理方法^[8,9]

南瓜种子经催芽后播种于培养箱中,按常规方法在 25~28 温室中 12 h/12 h 光暗周期培养。

1.4 叶盘法统计 DAB 染色侵染位点数

将经药剂处理并分别接种 10 h、22 h 后的叶盘漂浮于 DAB 染液中避光染色 8 h,分别于接种后 18 h、30 h 浸入乙醇-乙酸 (3:1, 体积比) 中脱色,直到叶绿素完全脱去。滴加 50 μL 苯胺蓝染液对菌体进行染色 20 min。整个过程需避光进行。显微镜 (Nikon YS100) 下观察统计苯胺蓝染色菌体的 DAB 染色侵染位点数并摄影记录^[6,7]。每处理设 20 个重复。

1.5 蛇床子素对菌丝生长与产孢的影响

药剂处理并接菌后的叶盘分别于接菌后 24、48、72、96、120 h 取样,浸入乙醇-乙酸 (3:1, 体积比) 中脱色,苯胺蓝染色后,镜检统计每个分生孢子产生的芽管数,用标尺测量其中最长的菌丝长度。摄影记录蛇床子素对分生孢子产生的影响^[9]。

2 结果与分析

2.1 离体叶片法测得的病情指数

用蛇床子素处理离体叶片 24 h 后接菌,调查

接种前一天将繁殖菌源的南瓜叶片上的白粉病菌老孢子弹掉,使其重新长出分生孢子。用毛笔轻轻将白粉病菌孢子刷入盛有清水的烧杯中,喷雾接种,之后在培养箱中保湿培养。根据实验内容不同分别采用离体叶片法和叶盘法对南瓜植株进行药剂处理。

离体叶片法:待南瓜幼苗长至第一片真叶完全展开时 (一叶一心期,约播种后 10 d,下同),剪取整个叶片,用浓度为 50、100 $\mu\text{g/mL}$ 的蛇床子素进行叶面喷雾,使雾滴布满叶片表面。放入培养皿 (内置蒸馏水湿润的滤纸) 中保湿培养,药剂处理后 24 h 接种白粉病菌。

叶盘法:剪取一叶一心期南瓜叶片,打成直径 1 cm 的叶盘,用浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的蛇床子素处理 24 h 后接种白粉病菌,保湿培养。

1.3 病情指数计算方法^[10]

每处理 10 张叶片,以每张叶片病斑面积占整个叶片面积的百分率分级。

分级方法:无病——0 级;病斑面积占整个叶面积 1% 以下——1 级;2%~5%——3 级;6%~20%——5 级;21%~40%——7 级;40% 以上——9 级。

接菌 6 d 后白粉病的病情指数。结果发现 50、100 $\mu\text{g/mL}$ 蛇床子素均能有效降低南瓜白粉病的病情指数 (图 1),接菌 10 d 后病斑也未见扩展。

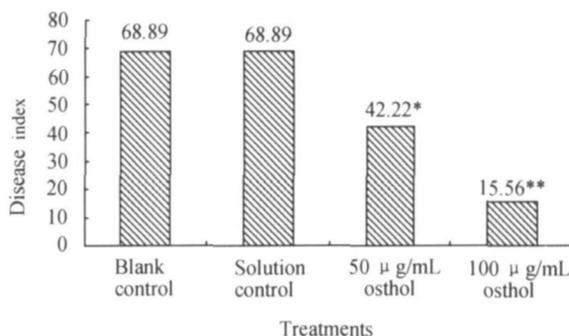


Fig 1 Disease index of detached leaves treated with osthol

* Mean values were significantly different between the treatment and the control ($P < 0.05$). The same as below.

** Mean values were significant different between treatments

2.2 DAB 染色白粉病菌侵染位点

成功入侵的白粉病菌分生孢子在入侵过程中

会在侵染位点诱导南瓜叶片产生 H_2O_2 , DAB 只要和 H_2O_2 接触就可以形成电子致密的沉淀, 本实验根据此原理研究了蛇床子素对南瓜白粉病菌侵染的影响^[6,7]。白粉病菌分生孢子入侵过程中南瓜叶片上 DAB 染色侵染位点的动态变化如下: 接种后 10 h, 显微观察发现叶盘上病菌入侵部位开始出现 DAB 染色侵染位点, 附着胞粘着位点寄主细胞被染成棕褐色 (图 2A)。接种后 18 h 染色位点

数急剧增加, 接种后 30 h 整个寄主细胞被染成棕褐色 (图 2B)。100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 蛇床子素处理的叶盘上, DAB 染色侵染位点在接种后 18 h 和 30 h 都明显少于对照 (图 3; 图 2A), 说明蛇床子素可以有效地阻止白粉病菌的入侵。100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 蛇床子素处理的叶盘在接种后 30 h 只有少数寄主细胞整个被染成棕褐色, 处理后的叶盘上未出现寄主植物局部坏死。

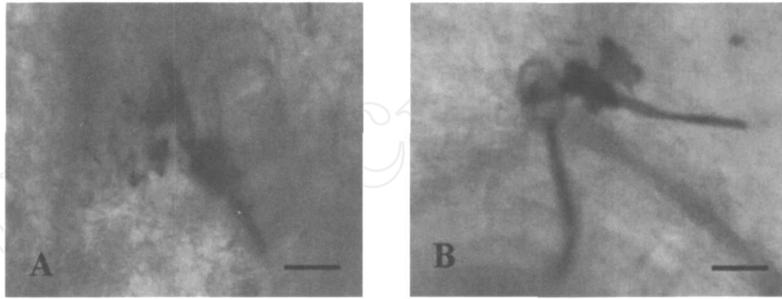


Fig 2 A. Incidence of interaction sites with H_2O_2 in attacked cell after inoculation with *S. fuliginea*. At 10 h after inoculation, leaves were placed in solution of 1 mg/mL DAB for 8 h. At 18 h (at the indicated time point), leaf disks were analyzed by DAB staining subjacent to appressorial germ tube. B. The whole-cell DAB staining. Bar in (A) and (B) = 30 μm .

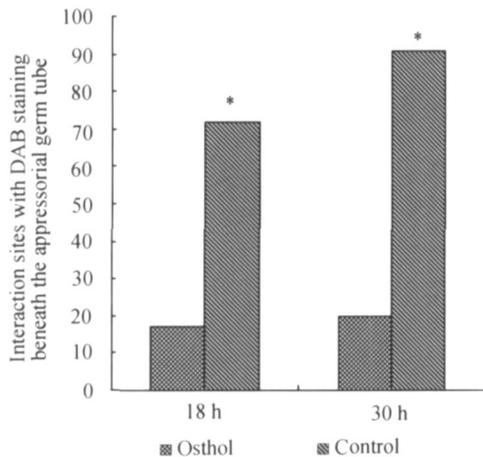


Fig 3 Incidence of interaction sites with H_2O_2 using DAB staining in attacked cell after inoculation with *S. fuliginea*

* Leaf disks treated with osthol (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was inoculated. At 10 h and 22 h after inoculation, leaf disks were placed in solution of 1 mg/mL DAB for 8 h. At 18 h and 30 h (at the indicated time point), leaf disks were analyzed for DAB staining subjacent to appressorial germ tube. Twenty independent leaf disks gave very similar result

2.3 对白粉病菌菌丝生长的影响

分别于接种后 24、48 和 72 h 统计芽管数, 发现蛇床子素可以有效抑制芽管的产生 (表 1)。接

菌后 72 h, 对照叶盘上有 85% 的萌发孢子产生了多个芽管, 而 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 蛇床子素处理的叶盘上萌发的孢子仅有 14% 具有多个芽管。对照的萌发孢子大多数都具有 3 个芽管, 蛇床子素处理的孢子具有一个芽管的占大多数。蛇床子素对菌丝伸长也有显著影响, 接种后 48 h 对照菌丝的平均长度接近 400 μm , 蛇床子素处理的菌丝平均长度仅有 122 μm (表 1)。

2.4 对白粉病菌产孢的影响

显微观察发现, 蛇床子素处理的叶片上白粉病菌分子实层稀薄, 产孢量与对照相比明显下降 (图 4)。分生孢子产生时间与对照没有明显差异, 白粉病菌生活周期未见延滞。

3 讨论

长期以来蛇床子素主要被应用于医药上, 近几年才发现其对植物病原真菌有显著的抑制作用^[5]。石志琦^[5]、沈寿国^[11]等曾报道蛇床子素对死体营养生物小麦赤霉病菌 *Fusarium graminearum* 可能的作用机制, 研究了蛇床子素对小麦赤霉病菌菌体葡萄糖、钙吸收、三磷酸腺苷 (ATP) 酶和细胞壁形成相关酶 -1, 6 葡聚糖酶活性的影响, 探讨了蛇床子素对小麦赤霉病菌细胞壁形成

Table 1 Effects of osthol (100 $\mu\text{g/mL}$) on mycelial growth of powdery mildew on leaf disk of pumpkin

Treatments	Percentage geminated conidia with multiple gem tube			Number of gem tubes geminated conidia			Maximum colony length of hyphae/ μm		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Water	38 a	65 a	83 a	1.13 a	2.85 a	3.35 a	127.89 a	410.00 a	--
Solvent	36 a	68 a	85 a	1.10 a	2.55 a	3.30 a	132.70 a	396.25 a	--
Osthol	4 b	12 b	14 b	1.22 a	1.35 b	1.85 b	44.83 b	122.70 b	--

Note: Values with letter in common within a column were not statistically significant ($P < 0.05$), LSD test. Based on at least 100 independent observations. -- Hyphae was too long.

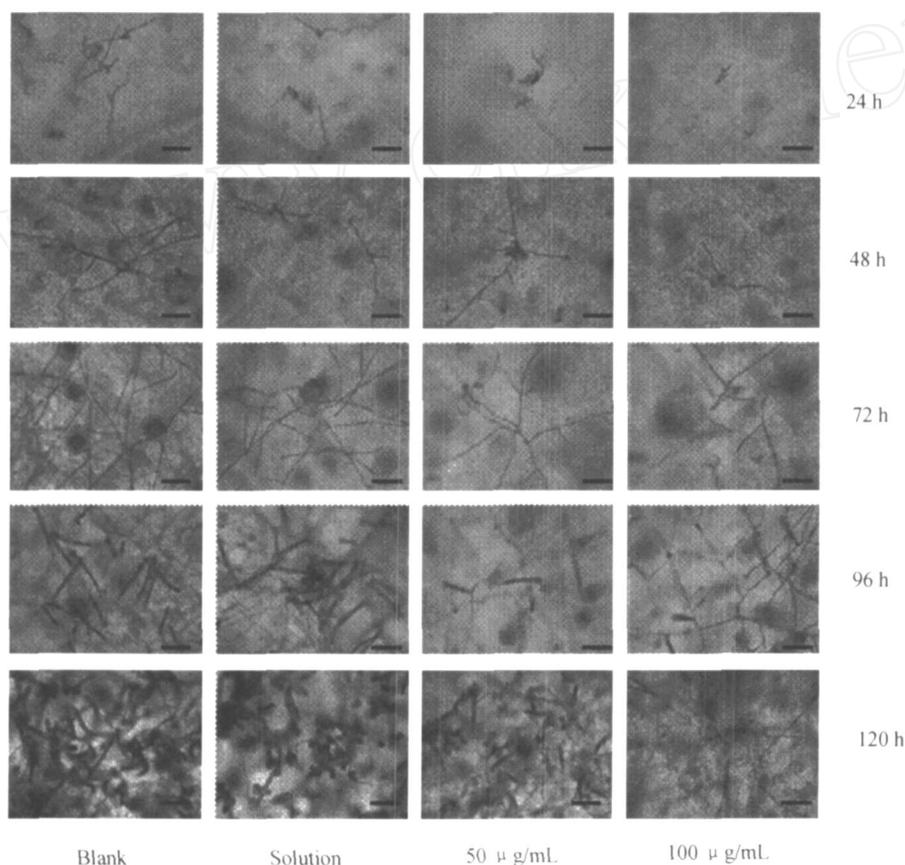


Fig 4 Effect of osthol on mycelial growth and conidiation after inoculation for 24, 48, 72, 96 and 120 h (Bar = 100 μm)

的影响。发现蛇床子素处理后对 α -1,6 葡聚糖酶活性没有明显影响,但影响了葡萄糖和钙的吸收,对 ATP 酶活性也有抑制作用。处理后菌丝断裂,可能是影响了细胞壁的形成。严清平^[12]等发现 80~125 $\mu\text{g/mL}$ 蛇床子素对草莓白粉病菌 *Sphaerotheca pannosa* 引起的病害防效达 68.7%~79.5%;王春梅^[13]等发现 25、20、16.7 $\mu\text{g/mL}$ 蛇床子素对黄瓜白粉病菌引起的病害在第 3 次施药后 7 d 防效达 97.73% 以上。严清平^[12]等还发现,蛇床子素对草莓白粉病菌孢子萌发具有强烈的抑制作用,60 $\mu\text{g/mL}$ 蛇床子素处理离体白粉病菌孢子 24 h 后即能完全抑制其萌发。本试验主要

是针对蛇床子素防治活体营养生物南瓜白粉病菌的研究,采用室内离体叶片法测定了蛇床子素防治南瓜白粉病的效果,发现蛇床子素可以显著降低白粉病的发病程度。显微观察发现蛇床子素能够有效抑制南瓜白粉病菌的侵入。

DAB 和 H_2O_2 接触形成电子致密沉淀的反应灵敏,显微观察不需要经过复杂的植物组织处理过程就可以检测植物与病原菌互作过程中的细胞学定位。杨民和等^[7]采用该方法定位观察了水稻受稻瘟病菌 *Sphaerotheca pannosa* 侵染的过程。本文中作者采用该方法研究白粉病菌与寄主的互作过程,为专性寄生菌的研究提供了新的思路。结

果表明蛇床子素能够有效地减少分生孢子的入侵,从而阻止分生孢子在寄主上的定殖。

采用苯胺蓝染色法对白粉病菌菌丝进行染色,发现在蛇床子素处理的叶片上,能够成功入侵的分生孢子菌丝生长受抑制,形成的子实层稀薄,产孢量也明显少于对照。说明蛇床子素不仅影响白粉病菌的入侵,也减少了进入下一侵染循环的分生孢子数,有可能影响白粉病菌的再侵染。

至于蛇床子素影响白粉病菌的侵染是因为诱导作用使寄主产生了对白粉病菌的抵抗力,还是通过抑制白粉病菌本身的发育而影响病菌侵染过程中的关键物质等问题还有待进一步研究解决。

参考文献:

- [1] YPEMA H L, YPEMA M, GUBLER W D. Sensitivity of *Uromyces necator* to Benomyl, Triadimefon, Myclobutanil, and Fenarimol in California [J]. *Plant Dis*, 1997, 81: 293-297.
- [2] HOLLOMON D W, WHEELER I, DIXON K, et al Defining the Resistance of the New Powdery Mildew Fungicide Quinoxifen [J]. *Pestic Sci*, 1999, 51 (3): 347-351.
- [3] WILCOX W F, BURR J A, RIEGEL D G. Practical Resistance to QoI Fungicides in New York Populations of *Uromyces necator* Associated with Quantitative Shifts in Pathogen Sensitivities [J]. *Phytopathol*, 2003, 93: S90.
- [4] ZHOU Yi-lin (周益林), DUAN Xia-yu (段霞瑜), SHENG Bao-qin (盛宝钦). 植物白粉病的化学防治进展 [J]. *Chin J Pestic Sci (农药学报)*, 2001, 3 (2): 12-18.
- [5] SHI Zhi-qi (石志琦), SHEN Shou-guo (沈寿国), XU Lang-lai (徐朗莱), et al 蛇床子素对植物病原真菌抑制机制的初步研究 [J]. *Chin J Pestic Sci (农药学报)* 2004, 6 (4): 28-32.
- [6] Hückelhoven R, Fodor J, Preis C. Hypersensitive Cell Death and Papilla Formation in Barley Attacked by the Powdery Mildew Fungus are Associated with Hydrogen Peroxide but not with Salicylic Acid Accumulation [J]. *Plant Physiology*, 1999, 119: 1251-1260.
- [7] YANG Min-he (杨民和), ZHENG Zhong (郑重), LEACH J E. 水稻受稻瘟病菌侵染后过氧化物酶定位的超微观察 [J]. *Chin J Rice Sci (中国水稻科学)*, 2002, 16 (1): 57-62.
- [8] LI Y H, WINDHAM M T, TRIGIANO R N. Spore Germination, Infection Structure Formation, and Colony Development of *Erysiphe pulchra* on Dogwood Leaves and Glass Slides [J]. *Plant Disease*, 2005, 89: 1301-1304.
- [9] SINGH U P, PRITHIVIRAJ B, NEEMAZAL. A Product of Neem (*Azadirachta indica*), Induces Resistance in Pea (*Pisum sativum*) against *Erysiphe pisi* [J]. *Physiol Molec Plant Pathol*, 1997, 51: 181-194.
- [10] XU Ying (续英). ISBN 7-5066-0896-0/5011, 杀菌剂防治黄瓜白粉病药效试验准则——农药田间药效试验准则(一) [S]. Beijing (北京): Standards Press of China (中国标准出版社), 1993: 56-60.
- [11] SHEN Shou-guo (沈寿国), SHI Zhi-qi (石志琦), XU Lang-lai (徐朗莱), et al 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]. *Chin J Pestic Sci (农药学报)*, 2005, 7 (2): 135-139.
- [12] YAN Qing-ping (严清平), LU Xin-ren (陆信仁), XIA Li-ru (夏礼如), et al 天然化合物蛇床子素防治草莓白粉病 [J]. *Chin J Pestic (农药)*, 2005, 44 (3): 136-137.
- [13] WANG Chun-mei (王春梅), WU Gui-ben (吴桂本), WANG Ying-zi (王英姿), et al 蛇床子素防治黄瓜白粉病研究 [J]. *Jiangsu Agric Sci (江苏农业科学)*, 2005, (4): 57-58.

(Ed J N S H)