

丙烷脒对灰霉病菌菌丝形态和超微结构的影响

陈安良^{1,2}, 冯美杰¹, 冯俊涛^{1,2}, 何军^{1,2}, 张兴^{1,2}

(¹西北农林科技大学无公害农药研究服务中心, 杨凌 712100; ²陕西省生物农药工程技术研究中心, 杨凌 712100)

摘要:【目的】杀菌剂对病菌菌丝形态和超微结构的影响, 是进行杀菌剂作用机理研究的基础。【方法】采用扫描电镜和透射电镜, 研究了丙烷脒对灰霉病菌菌丝形态和超微结构的影响。【结果】药剂处理 1 d 后, 菌丝局部不规则膨胀, 菌丝隔膜间距变短; 药剂处理 3 d, 菌丝局部严重膨大, 且膨胀部位失水畸形。透射电镜观察表明, 药剂处理 1 d 后, 菌丝细胞线粒体体积增大、数目增多, 细胞核的结构已不明显, 细胞内出现囊泡; 3 d 后, 各细胞器结构紊乱, 并含有大量的无膜透明内含物, 有较大的空腔形成, 细胞壁外围沉积大量的外渗物, 菌丝组织坏死。【结论】丙烷脒对灰霉病菌菌丝形态和超微结构的影响不同于常用杀菌剂品种, 预示丙烷脒的作用机理独特。对丙烷脒作用机理进行深入研究, 有望发现杀菌剂新的作用靶标, 为杀菌剂新品种的开发提供依据。

关键词: 丙烷脒; 灰霉病菌; 超微结构

Effects of Propamidine on Mycelial Morphology and Ultrastructure of *Botrytis cinerea*

CHEN An-liang^{1,2}, FENG Mei-jie¹, FENG Jun-tao^{1,2}, HE Jun^{1,2}, ZHANG Xing^{1,2}

(¹Biorational Pesticide Research and Development Center, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100;
²Shaanxi Research Center of Biopesticide Engineering and Technology, Yangling 712100)

Abstract: 【Objective】The research on the effects of fungicide on morphology and ultrastructure of fungi mycelia cell was the basic of antifungi mechanism. 【Method】The effects of propamidine, a novel fungicide, on morphology and ultrastructure of mycelial cell of *Botrytis cinerea* were investigated under light scanning and transmission electronic microscopy. 【Result】The studies revealed that propamidine caused a series of marked morphology and structural alterations of hyphae. Treated with propamidine after one day, the space between mycelium septum was shortened, the part of mycelium swelled, and the volume of mycelium cell mitochondrion was swollen. Its number increased, and the cell nuclei also displayed an alteration. After three days, the swelled part of mycelium was malformed and the configuration of mycelium cell was destroyed. 【Conclusion】Compared with other fungicides, the changes of morphology and ultrastructures of mycelial cell induced by propamidine were unique. Therefore the antifungi mechanism of propamidine was worthy of studying.

Key words: Propamidine; *Botrytis cinerea*; Ultrastructure

0 引言

【研究意义】灰霉病是保护地蔬菜生产中的一种主要病害, 化学防治是蔬菜灰霉病害的主要防治措施^[1], 高强度、高频次的化学防治, 致使灰霉病菌已对常用的杀菌剂产生了抗药性^[2]。开发作用机制特异、无交互抗性的杀菌剂品种, 是解决灰霉病防治及其抗

药性治理的一条重要途径。丙烷脒是由西北农林科技大学无公害农药研究服务中心研制开发的一种新型杀菌剂, 对其作用机理的研究是探讨丙烷脒抗药性产生和丙烷脒田间应用的理论依据。【前人研究进展】前期研究表明, 丙烷脒对作物灰霉病防效高、用药量低, 对人畜及环境生物安全, 是一种无公害杀菌剂, 具有良好的推广应用前景^[3]。【本研究切入点】目前对丙

收稿日期: 2005-03-07; 接受日期: 2006-11-21

基金项目: 国家“十五”攻关(2002BA516A04); 西北农林科技大学科研专项基金

作者简介: 陈安良(1963-), 男, 陕西西乡人, 副教授, 博士, 研究方向为农药化学研究。Tel: 029-87091884; E-mail: anlchen@126.com

烷脒的杀菌作用机理还未进行研究。为此，采用电镜技术研究了丙烷脒对灰霉病菌菌丝形态和超微结构的影响。【拟解决的关键问题】本研究旨在揭示丙烷脒对灰霉病菌菌丝的作用位点，为丙烷脒杀菌剂的作用机理研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

丙烷脒原药（90%，其中含 8%水分，2%无抑菌活性的杂质）。番茄灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*)，由西北农林科技大学无公害农药研究服务中心提供。

1.2 试验方法

样品处理和取样：将番茄灰霉菌接种于培养皿内 PDA 培养基上培养 3 d。用无菌水配制浓度为 20 mg·L⁻¹ 的药液，将无菌滤纸 (0.75cm×6.0cm) 浸入药

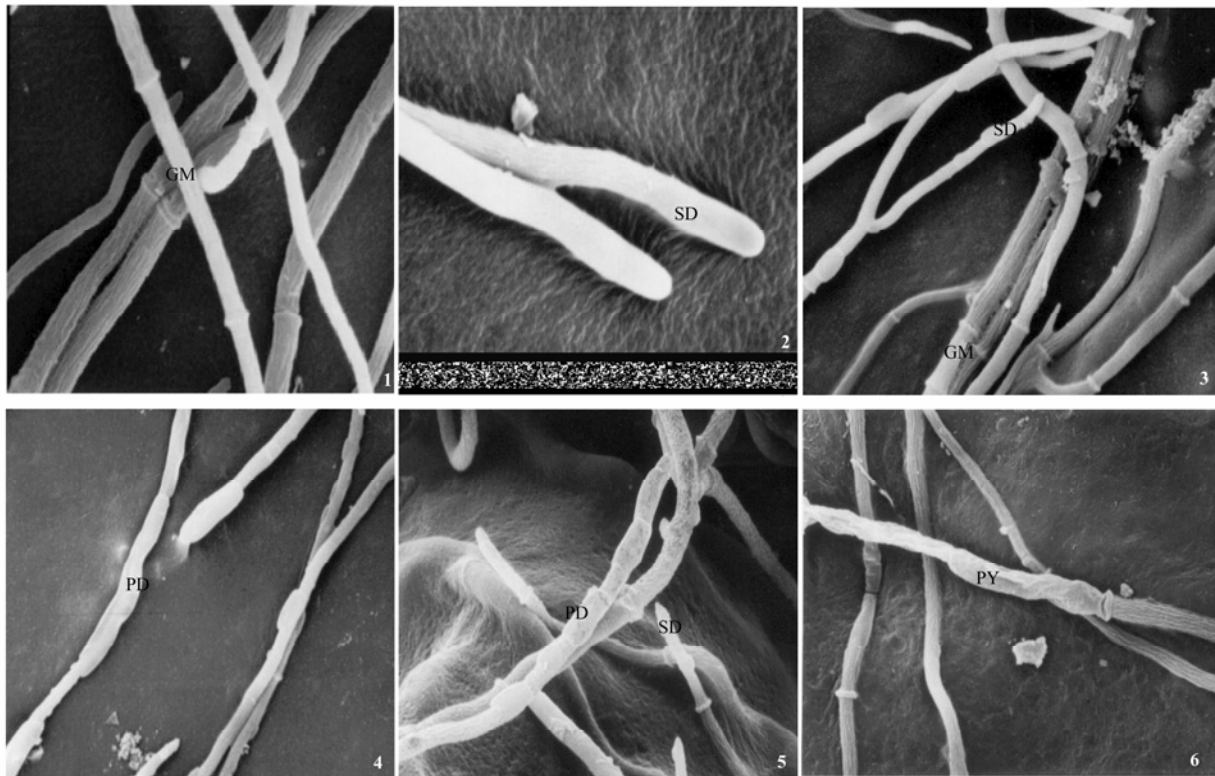
液后置于皿内的灰霉病菌菌丝周围，围成 4cm×4cm 的正方形，对照为无菌水处理。置于 25℃ 培养室内培养 1 d 和 3 d 后分别取样。取菌落边缘药液与病菌交界处菌丝较稀松部位制备扫描电镜样品；取菌落边缘药液与病菌交界处菌丝较稠密部位制备透射电镜样品。

扫描电镜和透射电镜样品的加工按康振生^[4]的方法进行。

2 结果与分析

2.1 扫描电镜观察结果

未经药剂处理的菌丝纤细、均匀，表面光滑，菌丝隔膜间距较长 (图 1-1、2)；药剂处理 1 d 后，菌丝局部不规则膨胀，菌丝隔膜间距变短 (图 1-3、4)；3 d 后，菌丝局部严重膨大，菌丝膨胀部位失水畸形 (图 1-5、6)。药剂处理的菌丝生长点正常。



1 (1000×)、2 (1200×)：对照新生菌丝均匀，表面光滑，隔膜间距较大；菌丝生长点均匀；3 (×700)、4 (×700)：丙烷脒处理 1 d，菌丝局部肿胀，隔膜间距变短，生长点正常；菌丝局部膨大。5 (×1000)、6 (×1000)：丙烷脒处理 3d，菌丝局部严重膨大；肿胀部位失水畸形。SD-生长点；GM-隔膜间距；PD-膨大部位；PY-膨大缢缩部位

1(1000×), 2(1200×): untreated young mycelium uniform in shape; the mycelium tip was slim. 3(×700), 4(×700):1 day after treated, the space between mycelium septum was shortened, and the mycelium tip was normal, the part of mycelium was swelled. 5(×1000), 6(×1000):3 days after treated, the part of mycelium was swelled heavily; the swelled part of mycelium was malformed. GM: the space between mycelium septum; SD: mycelium tip; PD: the swelled part of mycelium; PY: the malformation part

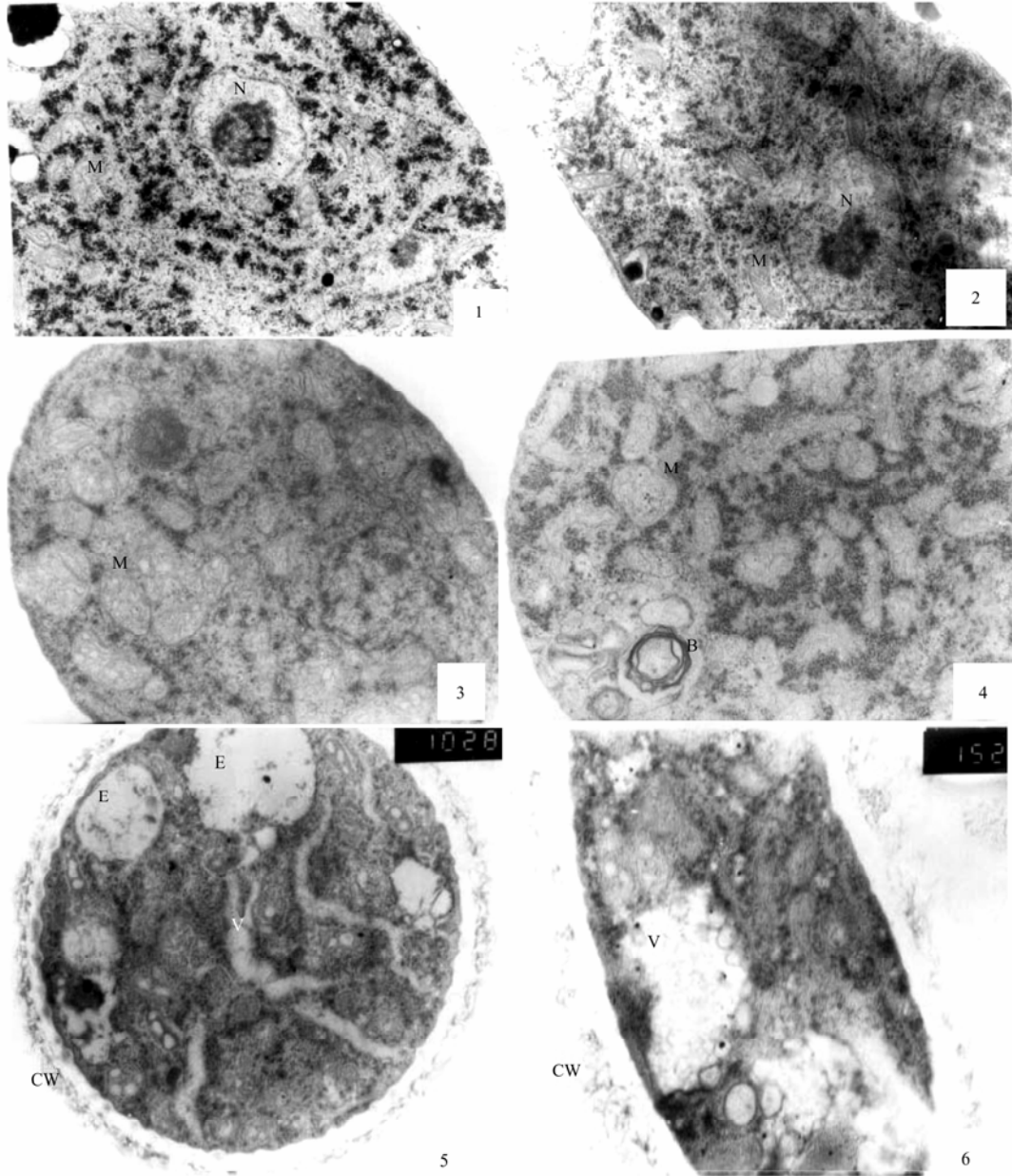
图 1 对照和处理的番茄灰霉病菌菌丝形态扫描电镜照片

Fig. 1 The untreated and treated mycelium shape by light scanning

2.2 透射电镜观察结果

未经药剂处理的菌丝细胞,各种细胞器结构完整,胞外无外渗物,线粒体均匀,细胞核结构完整(图 2-1, 2)。药剂处理 1 d 后,菌丝线粒体体积增大、数目增多;细胞核的结构已不明显;细胞内出现囊泡(图 2-3,

4)。药剂处理 3 d 后,各细胞器结构紊乱,并含有大量的无膜透明的内含物,有较大的空腔形成;菌丝细胞外有染色较深的物质,可能是细胞膜通透性遭到破坏,导致细胞壁外围沉积大量的不明外渗物所致。细胞内部形成大量的囊泡,聚积为较大空腔,菌丝组织



1 (横切)、2 (纵切)(1000×): 对照菌丝, 细胞核完整, 线粒体均匀, 内嵴正常, 细胞壁完整; 3、4 (1500×): 对照菌丝细胞, 线粒体体积膨胀, 数目增多, 细胞核结构不明显; 胞内出现不明囊泡。5 (横切)、6 (纵切)(1000×): 菌丝细胞结构紊乱, 胞内有大量无膜透明内含物, 细胞膜的通透性遭到破坏, 有大量物质外渗。M-线粒体; N-细胞核; B-囊泡; E-空腔; V-无膜内含物; CW-细胞壁
 1 (horizontal section), 2 (vertical section)(1000×): the nucleus and mitochondrion of mycelial cell was uniform; 3, 4 (1500×): 1 day after treated, the volume of cell mitochondrion was swollen and its number increased, the unknown vesicle was appeared inner cell; 5 (horizontal section), 6 (vertical section)(1000×): 3 days after treated, the mycelial cell configuration was destroyed, there was a lot of un-membrane material inner cell. M: The cell mitochondrion; N: The cell nucleus; B: The vesicle; E: Cavum; V: The un-membrane material; CW: Cell wall

图 2 对照和处理番茄灰霉菌菌丝细胞结构透射电镜照片

Fig. 2 The untreated and treated mycelial cell configuration under transmission electronic micrographs

基本坏死(图 2-5, 6)。

3 讨论

3.1 丙烷脒对灰霉病菌菌丝形态及超微结构的影响不同于其它杀菌剂品种

丙烷脒对番茄灰霉病菌菌丝形态的影响主要表现为使菌丝膨大;菌丝隔膜间距变短;而对菌丝生长点的影响不是很明显。菌丝局部膨大,隔膜间距变短,均是菌丝在严重不良环境下生长受到抑制的表现,说明丙烷脒作用于病菌菌丝后,使菌丝处于不良生长环境,抑制了病菌菌丝的正常生长。丙烷脒处理 1 d,菌丝线粒体体积膨大、数目增多,形态发生较大变化。电镜图片中细胞核的结构已不明显,说明细胞核的结构同时发生了变化;3 d 后,菌丝细胞内出现空腔,各种细胞器形态变异,胞内有不明内含物,细胞质外渗。

杀菌剂对病菌菌丝形态的影响和其作用机理有着密切的联系。三唑类杀菌剂是目前杀菌剂品种中生产和应用最多的一类杀菌剂品种,主要通过阻碍真菌麦角甾醇的生物合成而影响真菌细胞壁的形成^[5]。其对植物病原菌菌丝形态和超微结构影响主要表现在使菌丝不规则肿胀,分枝明显增多,菌丝细胞壁不规则加厚,形成不均匀的隔膜^[6-9]。其他类杀菌剂随着其作用机理不同,对病菌细胞形态的影响也不相同。黄青春等^[10]报道了烯酰吗啉对疫霉属真菌细胞的影响,主要表现在使菌丝细胞壁物质大面积增生和畸形沉积。Jiang 等研究了乙磷铝对马铃薯晚疫病菌细胞的影响,乙磷铝对马铃薯晚疫病菌细胞核及原生质没有影响,而主要影响病菌吸器的形态^[11]。恶霜灵可引起番茄晚疫病菌细胞核的退化,细胞质中核糖体数量减少,表明恶霜灵抑制了病菌细胞核糖体的合成^[12]。丙烷脒对病菌菌丝形态和超微结构的影响和其他杀菌剂明显不同,表明丙烷脒的作用位点不同,预示丙烷脒的抑菌机理和现用的杀菌剂有很大的差异。

3.2 丙烷脒可能作用于菌丝细胞的 DNA

丙烷脒属芳香二脒类化合物,该类化合物在医学已有应用^[13]。丙烷脒作为一种抗菌药物,主要用于治疗 *Acanthamoeba keratitis* 以及其它角膜疾病感染^[14]。医学研究表明,丙烷脒对 *Acanthamoeba keratitis*、*Pneumocystis carinii* 等病原物的作用机制是结合于病原物双螺旋 DNA 窄沟富含 AT 碱基对区域,影响 DNA 的转录、翻译等生物过程,达到抑制病原物的目的^[15]。本研究表明丙烷脒的作用位点是细胞核和线粒体。可以推测,丙烷脒作用于灰霉菌后,首先与细胞核中的

DNA 和(或)线粒体中的 DNA 结合,进而影响细胞的生理生化过程,使细胞的代谢紊乱,最终导致病菌细胞死亡。虽然从试验结果还无法准确判断丙烷脒的第一作用位点是细胞核或是线粒体,但从丙烷脒对菌丝细胞形态和超微结构的影响情况可知,丙烷脒对病菌的作用机制不同于三唑类、嘧啶胺类^[16]和其他常用杀菌剂。

3.3 丙烷脒杀菌剂的研究开发前景

初步研究表明,丙烷脒的作用机理独特,不同于常用的杀菌剂品种。丙烷脒的推广和应用不会受到病菌交互抗性的限制。丙烷脒的分子结构简单,且具有很强的修饰性,其系列衍生物是开发新型杀菌剂的宝贵资源^[17]。对其作用机理的进一步研究,很可能发现杀菌剂新的作用靶标和作用机理,可为丙烷脒及其系列杀菌剂品种的开发和应用提供理论依据。

4 结论

丙烷脒对灰霉病菌菌丝细胞的形态以及线粒体和细胞核均有影响,可能作用于细胞核及线粒体中的 DNA,影响了细胞的生理生化过程而致细胞死亡。丙烷脒的作用机理不同于常用杀菌剂品种,其推广和应用不会受病菌交互抗性的影响。对其作用机理的深入研究,具有重要的理论和应用价值。

References

- [1] 杨涛,关天舒. 保护地番茄灰霉病菌抗药性治理策略的理论模型与实践. 中国农业科学, 2002, 35: 1030-1032.
Yang T, Guan T S. Theoretical model of fungicide resistance management strategy of tomato gray Mold in greenhouse and its practice. *Scientia Agricultural Sinica*, 2002, 35: 1030-1032. (in Chinese)
- [2] 袁章虎,张小凤,韩秀英. 灰霉菌抗药性研究进展. 河北农业大学学报, 1996, 19(3): 107-110.
Yuan Z H, Zhang X F, Han X Y. Research progress of fungicide resistance of *Botrytis cinerea*. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 1996, 19(3): 107-110. (in Chinese)
- [3] 陈安良,廉应江,叶海洋,冯俊涛,张兴. 丙烷脒防治番茄灰霉病效果初报. 中国农学通报, 2005, 21(11):301-303.
Chen A L, Lian Y J, Ye H Y, Feng J T, Zhang X. The bioactivity of novel fungicide propamidine against *Botrytis cinerea*. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2005, 21(11):301-303. (in Chinese)
- [4] 康振生. 植物病原菌超微结构. 北京: 中国科学技术出版社, 1996,7-11.

- Kang Z S. *Ultrastructure of Plant Pathogenic Fungi*. Beijing: China Science and Technology Press, 1996: 7-11. (in Chinese)
- [5] 陈茹梅, 李金玉, 康振生, 邵映田. 戊唑醇对小麦纹枯菌超微结构的影响. 菌物系统, 2000, 19: 389-395.
- Chen R M, Li J Y, Kang Z S, Shao Y T. Effect of tebuconazole on ultrastructural changes of *Rhizoctonia cerealis*. *Mycosystema*, 2000, 19: 389-395. (in Chinese)
- [6] 韩青梅, 康振生, 黄丽丽, 蒋选丽. 戊唑醇对赤霉病生长发育影响的细胞学和免疫细胞化学研究. 菌物学报, 2004, 23: 580-589.
- Han Q M, Kang Z S, Huang L L, Jiang X L. Cytology and Immuno-Cytochemistry studies of effects of Tebuconazole on wheat head blight pathogen *in vitro*. *Mycosystema*, 2004, 23: 580-589. (in Chinese)
- [7] 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. 植物病理学报, 1996, 26(2): 111-116.
- Kang Z S, Shang H S, Jing J X. Effects of systemic fungicide Diniconazole on the development of stripe rust and powdery mildew on their host wheat. *Acta Phytopathologica Sinica*, 1996, 26(2): 111-116. (in Chinese)
- [8] Kang Z S, Huang L L, Buchenauer H. Ultrastructural and cytochemical studies of effects of the fungicide metconazole on *Fusarium culmorum in vitro*. *Zeitschrift fuer Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 2001, 108: 419-432.
- [9] 张新春, 康振生, 韩青梅, 景 岚, 黄丽丽. 杀菌剂羟菌唑对油菜菌核病菌生长发育的影响. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2004, 32(2): 25-30.
- Zhang X C, Kang Z S, Han Q M, Jiang L, Huang L L. Effect s of fungicide m etconazo le on the hyphal development of *Sclerotinia sclerotiorum* on Canola. *Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry*. (Nature Science Edition), 2004, 32(2): 25-30. (in Chinese)
- [10] 黄青春, 叶钟音. 烯酰吗啉(DMM)的特性及其作用机制. 农药科学与管理, 2000, 21(5): 28-31.
- Huang Q C, Ye Z Y. Character and mode of action of dimethomorph. *Pesticide Science and Administration*, 2000, 21(5): 28-31. (in Chinese)
- [11] Jiang, Y, Grossmann, F. Subcellular alterations in phytophthora infestans infecting tomato leaves treated with Fosetyl-Al. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1992, 44: 226-238.
- [12] Jiang Y. Effects of oxadixyl treatment on the ultrastructure of *Phytophthora infestans* infecting tomato leaves. *Pesticide Science*, 1992, 35 (2): 153-159.
- [13] Sands M, Kron M A, Brown R B. Pentamidine: a review. *Reviews of Infectious Diseases*, 1985, 7: 625-634.
- [14] Donkor I O, Tidwell R R, Jone S K. Pentamidine congeners. 2,2-butene-bridged aromatic diamidines and diimidazolines as potential anti-*Pneumocystis carinii* pneumonia agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1994, 37: 4554-4557.
- [15] Bailly C, Perrine D, Lancelot J C, Saturnino C, Robba M, Waring M J. Sequence-selective binding to DNA of bis(amidinophenoxy)alkanes related to propamidine and pentamidine. *Biochemical Journal*, 1997, 323(1): 23-31.
- [16] 马忠华, 叶钟音. 噻啉胺类杀菌剂作用机理. 农药科学与管理, 1997, 61(1): 30-32.
- Ma Z H, Ye Z Y. Mode of action of fungicides—Anilinopyrimidine. *Pesticide Science and Administration*, 1997, 61(1): 30-32. (in Chinese)
- [17] 康应江, 陈安良, 冯俊涛, 张 兴. 芳香二脒类化合物合成及抑菌活性的初步研究. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2005, 33(7): 45-48.
- Lian Y J, Chen A L, Feng J T, Zhang X. Synthesis and fungicidal activity of aromatic diamidines. *Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry*(Nature Science Edition), 2005, 33(7): 45-48. (in Chinese)

(责任编辑 王红艳)