

江绍锋, 史云静, 赵美, 等. 化学物质对水稻纹枯病菌黑色素形成的影响 [J]. 华南农业大学学报, 2020, 41(4): 49-56.
JIANG Shaofeng, SHI Yunjing, ZHAO Mei, et al. Effects of chemical substances on melanin formation of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA[J]. Journal of South China Agricultural University, 2020, 41(4): 49-56.

化学物质对水稻纹枯病菌黑色素形成的影响

江绍锋^{1,2}, 史云静¹, 赵 美¹, 舒灿伟¹, 周而勋¹

(1 华南农业大学 农学院/广东省微生物信号与作物病害防控重点实验室, 广东 广州 510642;

2 桂林医学院 基础医学院, 广西 桂林 541000)

摘要:【目的】水稻纹枯病是由立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani* AG-1 IA 融合群引起的真菌病害, 本研究旨在明确外界培养条件与水稻纹枯病菌黑色素形成的关系。【方法】采用菌丝生长速率法和紫外分光光度法, 测定化学肥料 [500 μg/mL K₂SO₄、NaH₂PO₄、CO(NH₂)₂]、金属离子 (5 μg/mL CuSO₄、FeSO₄、ZnSO₄)、抗氧化剂 (5 μg/mL 槲皮素、桑色素、抗坏血酸) 和对照 (300 μg/mL 苜蓿碱、50 μg/mL 儿茶酚、水) 对水稻纹枯病菌菌丝生长速率、菌核数量、菌核鲜质量和干质量以及黑色素含量的影响。【结果】500 μg/mL K₂SO₄、NaH₂PO₄ 和 CO(NH₂)₂, 5 μg/mL CuSO₄ 和 ZnSO₄, 5 μg/mL 槲皮素、桑色素和抗坏血酸以及 50 μg/mL 儿茶酚溶液对水稻纹枯病菌黑色素的形成均有促进作用。其中, 500 μg/mL 的 CO(NH₂)₂ 处理下, 水稻纹枯病菌产生黑色素最多, 为 113.2 mg; 而 300 μg/mL 的苜蓿碱处理下, 水稻纹枯病菌产生黑色素最少, 为 37.4 mg。【结论】水稻纹枯病菌黑色素的产生与菌丝生长速率和菌核发育没有必然的联系, 即抑制菌丝生长和菌核发育的化学物质, 不一定能够抑制黑色素的形成。本研究结果可为水稻纹枯病防控机理的研究提供依据。

关键词: 水稻纹枯病菌; 菌丝体; 菌核; 黑色素; 化学物质
中图分类号: S435.111.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2020)04-0049-08

Effects of chemical substances on melanin formation of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA

JIANG Shaofeng^{1,2}, SHI Yunjing¹, ZHAO Mei¹, SHU Canwei¹, ZHOU Erxun¹

(1 College of Agriculture, South China Agricultural University/Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Signals and Disease Control, Guangzhou 510642, China; 2 School of Basic Medical Sciences, Guilin Medical University, Guilin 541000, China)

Abstract: 【Objective】Rice sheath blight, caused by *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, is an important fungal disease. The purpose of this study was to determine the relationship between external culture conditions and melanin formation of *R. solani* AG-1 IA. 【Method】The effects of four different treatment groups, *i. e.* chemical fertilizer group [500 μg/mL K₂SO₄, NaH₂PO₄, CO(NH₂)₂], metal ion compound group(5 μg/mL CuSO₄, FeSO₄, ZnSO₄), antioxidant group (5 μg/mL quercetin, morin, vitamin C) and control group (300 μg/mL hyoscyamine, 50 μg/mL catechol, water), on the mycelial growth rate, sclerotia number, sclerotial fresh weight and dry weight as well as melanin content of *R. solani* AG-1 IA were determined by measuring mycelial growth rate and ultraviolet spectrophotometry. 【Result】Chemical fertilizer [500 μg/mL K₂SO₄, NaH₂PO₄, CO(NH₂)₂], metal ion compound (5 μg/mL CuSO₄, ZnSO₄), antioxidant(5 μg/mL quercetin, morin, vitamin C) and catechol(50 μg/mL) could promote the formation of melanin. Under the treatment of 500 μg/mL CO(NH₂)₂, the

melanin content of *R. solani* AG-1 IA was the highest (113.2 mg), while under the treatment of 300 µg/mL hyoscyamine, the melanin content of *R. solani* AG-1 IA was the lowest (37.4 mg). 【Conclusion】 Melanin formation is not necessarily related to mycelial growth and sclerotial development, *i.e.* the chemical substances, which have inhibitory effect on mycelial growth and sclerotial development, might have no inhibition on melanin formation. The results of this study provide a basis for understanding the mechanism for prevention and control of rice sheath blight.

Key words: *Rhizoctonia solani* AG-1 IA; mycelium; sclerotium; melanin; chemical substance

水稻纹枯病是由立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani* AG-1 IA 融合群引起的由土壤传播的植物病原真菌病害^[1]。水稻纹枯病菌菌核的生长发育可以分为菌丝生长、菌核萌发和菌核的成熟黑化 3 个阶段^[2]。黑色素广泛存在于动物、植物、真菌和细菌细胞中,是一种相对分子质量较大的化合物,多为非均质的多酚聚合体^[3]。真菌黑色素是一种深褐色或黑色的色素,多存在于细胞壁中,具有抗氧化、抗紫外线、抵抗溶菌酶和寄主免疫攻击等生物学功能^[4-5]。

水稻纹枯病菌主要以菌核的形式在土壤中越冬,而菌核中的黑色素能增强水稻纹枯病菌在不良环境下的生存能力,所以研究水稻纹枯病菌菌核以及黑色素发育机制有重要的理论和实际应用意义,但是国内外对菌核的研究主要集中于菌核发育方面,对水稻纹枯病菌菌丝生长和菌核发育机制以及黑色素形成的研究不多^[6-8]。黑色素不仅能够增强菌丝和菌核在土壤中的生存能力,而且也是植物病原

真菌重要的毒力因子^[9-10]。因此,研究化学物质对水稻纹枯病菌黑色素形成的影响,有助于开发新型、高效的杀菌剂抑制水稻纹枯病菌的菌丝生长和菌核发育,从而达到防治水稻纹枯病的目的。

1 材料与方法

1.1 材料

水稻纹枯病菌 *R. solani* AG1-IA 强致病力菌株 GD-118^[11] 由广东省微生物信号与作物病害防控重点实验室提供。

马铃薯葡萄糖液体培养基 (Potato dextrose broth, PDB) 制备参考方中达^[12]的方法。本研究使用的化学物质 (表 1) 均为分析纯试剂,过滤除菌后制备不同浓度的母液,并进一步稀释使用,其浓度见表 1。其中,莨菪碱为阴性对照,儿茶酚为阳性对照,水为空白对照。

表 1 本研究使用的化学物质及浓度
Table 1 Chemicals and concentrations used in this study

组别 Group	化学物质 Chemical		母液 Stock solution	
	组分 Component	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	溶剂 Solvent	$\rho/(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$
金属离子 Metal ion compound	CuSO ₄	5	ddH ₂ O	50
	ZnSO ₄	5	ddH ₂ O	50
	FeSO ₄	5	ddH ₂ O	50
抗氧化剂 Antioxidant	槲皮素 Quercetin	5	无水乙醇 Absolute ethanol	5
	桑色素 Morin	5	无水乙醇 Absolute ethanol	5
	抗坏血酸 Ascorbic acid	5	无水乙醇 Absolute ethanol	5
化学肥料 Chemical fertilizer	CO(NH ₂) ₂	500	ddH ₂ O	50
	NaH ₂ PO ₄	500	ddH ₂ O	50
	K ₂ SO ₄	500	ddH ₂ O	50
对照 Control	莨菪碱 Hyoscyamine	300	无水乙醇 Absolute ethanol	150
	儿茶酚 Catechol	50	无水乙醇 Absolute ethanol	100
	水 Water			

1.2 方法

水稻纹枯病菌 GD-118 菌株用 PDA 平板培养 2 d 后,用内径 5.0 mm 的打孔器在菌落边缘打取菌饼,置于培养基中央,将培养皿放在 12 h 光暗交替、28 ℃、相对湿度 62 % 的培养箱培养。以不加药剂

的处理为空白对照,加入一定量的母液试剂配成所需使用浓度的 PDA 平板。

1.2.1 化学物质对水稻纹枯病菌菌丝生长速率和菌核形成的影响 将供试菌株在 PDA 平板上培养 2 d 后,用内径 5.0 mm 的打孔器在菌落边缘打取菌

饼, 将菌饼移入含有不同药剂的 PDA 平板中央, 28 ℃ 条件下黑暗培养 24 h 后, 采用十字交叉法测量菌株的菌落直径, 每个处理浓度重复 3 次; 28 ℃ 条件下黑暗培养 21 d, 观察和记录菌株的菌核数量、大小、鲜质量和干质量, 每个处理重复 3 次。

1.2.2 水稻纹枯病菌黑色素的提取和纯化 水稻纹枯病菌菌核黑色素的提取和纯化参考 Chen 等^[13]建立的方法。

1.2.3 紫外可见光谱分析 称量水稻纹枯病菌黑色素 2 mg, 加少量 1 mol/L NaOH(pH 8.0) 溶解后, 以 ddH₂O 定容至 50 mL, 配成 40 μg/mL 黑色素溶液, 进行紫外-可见光连续扫描 (200~800 nm)。儿茶酚黑色素标准曲线设置: 称量儿茶酚标准品 4 mg, 加 1 mol/L NaOH(pH 8.0) 1 mL 溶解后定容至 50 mL, 配成 80 μg/mL 黑色素溶液, 稀释成 0、10、20、40 和 80 μg/mL 的黑色素溶液, 利用紫外分光光度计 (型号 U-2910; 日本 HITACHI 公司) 测定 $D_{217\text{ nm}}$, 并绘制出儿茶酚黑色素标准曲线 (0~80 μg/mL), 根据标准曲线计算出水稻纹枯病菌黑色素质量。

1.3 数据处理

试验数据利用 SPSS 19.0 软件进行处理, 采用 Duncan's 法进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 化学物质对水稻纹枯病菌菌丝生长和菌核质量的影响

不同化学物质对水稻纹枯病菌的菌丝生长速率的影响结果见表 2。由表 2 可以看出, 在化学肥

料组中, 在含 500 μg/mL K₂SO₄、NaH₂PO₄ 和 CO(NH₂)₂ 的培养基上培养 24 h 后, 水稻纹枯病菌菌丝生长速率差异显著, 菌落直径表现为 CO(NH₂)₂ 处理>K₂SO₄ 处理>NaH₂PO₄ 处理。与空白对照相比, 500 μg/mL 的 NaH₂PO₄ 和 K₂SO₄ 抑制水稻纹枯病菌菌丝生长, 而 500 μg/mL 的 CO(NH₂)₂ 促进水稻纹枯病菌菌丝生长。

在金属离子组中, 在含有 5 μg/mL CuSO₄、ZnSO₄ 和 FeSO₄ 的培养基上培养 24 h 后, 水稻纹枯病菌菌丝生长速率差异显著, 菌落直径表现为 FeSO₄ 处理>CuSO₄ 处理>ZnSO₄ 处理。与空白对照相比, 5 μg/mL CuSO₄ 和 FeSO₄ 能够促进水稻纹枯病菌菌丝的生长, 而 5 μg/mL 的 ZnSO₄ 抑制水稻纹枯病菌菌丝的生长。

在抗氧化剂组中, 在含有 5 μg/mL 槲皮素、桑色素和抗坏血酸的培养基上培养 24 h 后, 水稻纹枯病菌菌丝生长速率差异显著, 菌落直径表现为抗坏血酸处理>槲皮素处理>桑色素处理。与空白对照相比, 5 μg/mL 的槲皮素和桑色素能够抑制水稻纹枯病菌菌丝的生长, 而 5 μg/mL 抗坏血酸可以促进水稻纹枯病菌菌丝的生长。

在对照组中, 相对于空白处理, 300 μg/mL 的莨菪碱促进水稻纹枯病菌菌丝的生长; 而 50 μg/mL 的儿茶酚抑制水稻纹枯病菌菌丝的生长, 不同对照处理间水稻纹枯病菌菌丝生长速率差异显著。

不同化学物质对水稻纹枯病菌菌核质量的影响结果见表 2。由表 2 可见, 在化学肥料组中, 在含有 500 μg/mL K₂SO₄、NaH₂PO₄ 和 CO(NH₂)₂ 的培

表 2 化学物质对水稻纹枯病菌菌丝生长速率和菌核质量 (m) 的影响¹⁾

Table 2 Effects of chemicals on mycelial growth rate and sclerotial weight (m) of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA

组别	化学物质	ρ (化学物质)/(μg·mL ⁻¹)	d (菌落)/mm	$m_{\text{鲜}}/\text{g}$	$m_{\text{干}}/\text{g}$
Group	Chemical	Chemical content	Colony diameter	Fresh weight	Dry weight
化学肥料	K ₂ SO ₄	500	45.66±1.26b	0.487±0.041a	0.154±0.008a
	NaH ₂ PO ₄	500	40.89±0.87c	0.473±0.008a	0.139±0.004a
	CO(NH ₂) ₂	500	53.83±1.20a	0.499±0.027a	0.128±0.015a
金属离子	CuSO ₄	5	50.11±1.57b	0.175±0.003b	0.068±0.002b
	ZnSO ₄	5	47.52±1.13c	0.152±0.009b	0.057±0.004b
	FeSO ₄	5	58.13±0.82a	0.212±0.006a	0.081±0.004a
抗氧化剂	槲皮素 Quercetin	5	43.55±1.19b	0.347±0.021b	0.117±0.006b
	桑色素 Morin	5	37.71±1.28c	0.509±0.021a	0.149±0.003a
	抗坏血酸 Ascorbic acid	5	50.04±0.79a	0.414±0.009b	0.133±0.007b
对照	莨菪碱 Hyoscyamine	300	52.75±0.47a	0.434±0.009a	0.138±0.004a
	儿茶酚 Catechol	50	23.40±0.72c	0.401±0.023a	0.132±0.007a
Control	水 Water		49.23±0.62b	0.500±0.047a	0.148±0.011a

1)相同组别、同列数据后的不同小写字母表示差异显著($P<0.05$, Duncan's法)

1)Different lowercase letters in the same column of the same group indicate significant differences ($P<0.05$, Duncan's test)

培养基上培养 21 d 后, 水稻纹枯病菌的菌核鲜质量和干质量均差异不显著。

在金属离子组中, 在含有 5 $\mu\text{g/mL}$ CuSO_4 、 ZnSO_4 和 FeSO_4 的培养基上培养 21 d 后, FeSO_4 处理的水稻纹枯病菌菌核鲜质量和干质量均显著高于 CuSO_4 、 ZnSO_4 处理的, 但 CuSO_4 和 ZnSO_4 处理间的水稻纹枯病菌菌核鲜质量和干质量差异不显著。

在抗氧化剂组中, 在含有 5 $\mu\text{g/mL}$ 槲皮素、桑色素和抗坏血酸的培养基上培养 21 d 后, 桑色素处理的水稻纹枯病菌菌核鲜质量和干质量均显著高于槲皮素和抗坏血酸处理的, 但槲皮素和抗坏血酸处理间的水稻纹枯病菌菌核鲜质量和干质量差异

不显著。
在对照组中, 在含有 300 $\mu\text{g/mL}$ 莨菪碱、50 $\mu\text{g/mL}$ 儿茶酚培养基上培养 21 d 后, 与空白对照相比, 水稻纹枯病菌菌核鲜质量和干质量没有显著差异。

2.2 化学物质对水稻纹枯病菌菌核形态和分布以及菌核数量的影响

不同化学物质对水稻纹枯病菌菌核形态和分布以及数量的影响结果如图 1、图 2 所示。

在化学肥料组中, 水稻纹枯病菌在含有 500 $\mu\text{g/mL}$ K_2SO_4 、 NaH_2PO_4 和 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 的培养基上培养 21 d 后, 菌核形态分布有明显的差异 (图 1)。其中, $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 和 NaH_2PO_4 促进水稻纹枯病菌菌核的产

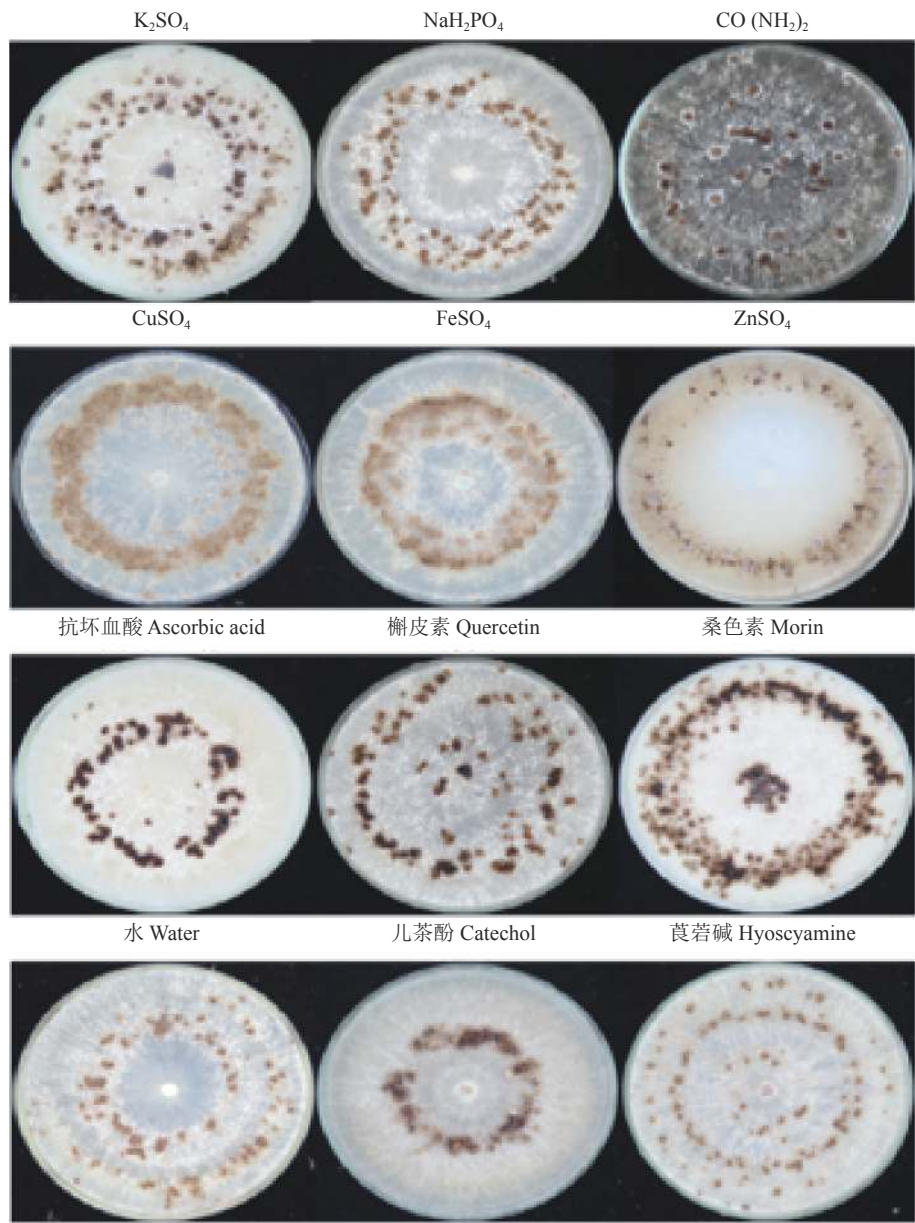


图 1 不同化学物质处理的水稻纹枯病菌菌核形态及分布

Fig. 1 Morphology and distribution of sclerotia of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA treated by different chemicals

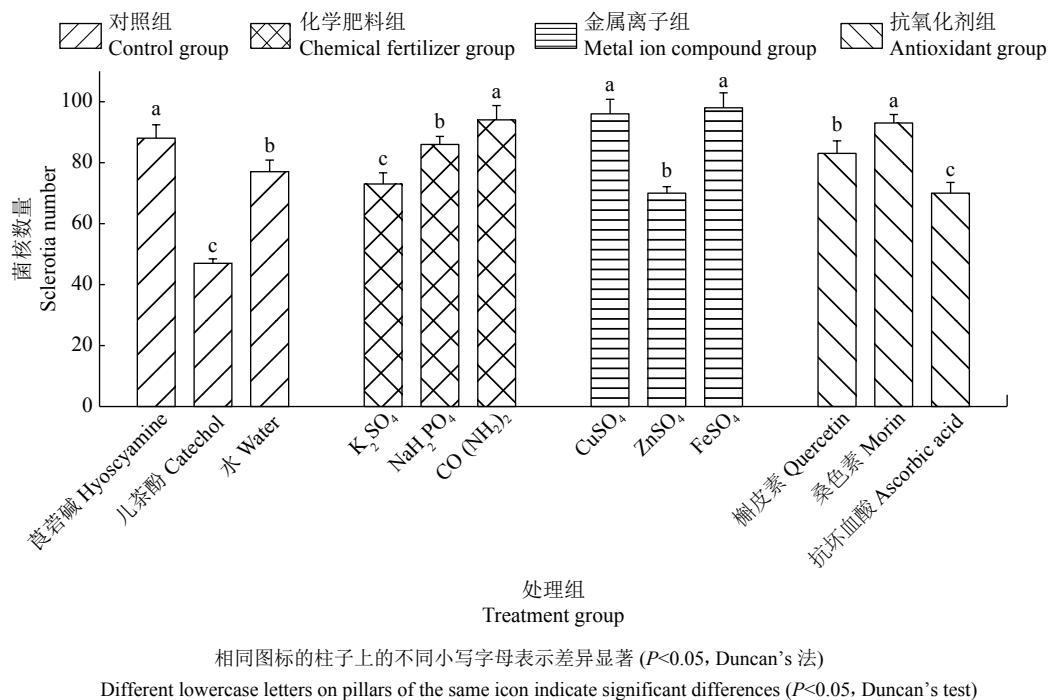


图 2 不同化学物质对水稻纹枯病菌菌核数量的影响

Fig. 2 Effects of different chemicals on sclerotia numbers of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA

生, 菌核数量增多。CO(NH₂)₂ 菌核数量最多, 每个培养皿平均产生 94 个菌核 (图 2), 同时也可以明显观察到水稻纹枯病菌菌丝的褐化甚至黑化现象, 并分泌黑色素到 PDA 培养基中 (图 1)。K₂SO₄ 溶液菌核数量最少, 每个培养皿中平均只能产生 73 个菌核 (图 2), 明显抑制菌核的产生。

在金属离子组中, 水稻纹枯病菌在含有 5 μg/mL CuSO₄、ZnSO₄ 和 FeSO₄ 的培养基上培养 21 d 后, CuSO₄ 和 FeSO₄ 促进水稻纹枯病菌菌核的产生, 菌核数量增多, 但与空白对照相比差异不显著, 每个培养皿平均能产生 90 个以上的菌核, 而 ZnSO₄ 菌核数量最少, 每个培养皿平均只能产生 70 个菌核, 抑制水稻纹枯病菌菌核的增加, 与 CuSO₄ 和 FeSO₄ 处理相比, 都有显著差异 (图 2)。

在抗氧化剂组中, 水稻纹枯病菌在含有 5 μg/mL 槲皮素、桑色素和抗坏血酸的培养基上培养 21 d 后, 菌核形态分布有较大差异 (图 1)。从图 2 可以看出, 槲皮素、桑色素和抗坏血酸处理的水稻纹枯病菌菌核数量有显著差异。槲皮素和桑色素能促进菌核的产生, 菌核数量增多, 其中, 桑色素溶液菌核数量最多, 每个培养皿中平均能产生 93 个菌核, 抗坏血酸溶液菌核数量最少, 每个培养皿平均只能产生 70 个菌核。

在对照组中, 在含有 300 μg/mL 的苄基碱、50 μg/mL 儿茶酚和空白对照的培养基上培养 21 d 后, 水稻纹枯病菌菌核形态分布有明显的差异, 结

果见图 1。各对照的水稻纹枯病菌菌核数量存在显著差异, 其中, 苄基碱促进菌核数量的增加, 每个培养皿平均产生 88 个菌核, 儿茶酚显著抑制菌核数量的增加, 每个培养皿平均只能产生 47 个菌核, 而空白对照每个培养皿平均能产生 77 个菌核 (图 2)。

2.3 化学物质对水稻纹枯病菌黑色素产生的影响

利用紫外-可见光谱对水稻纹枯病菌黑色素进行分析, 发现吸光度随波长的增大而减小, 在 217 nm 处有明显的强吸收峰, 即为水稻纹枯病菌黑色素的特征吸收峰 (图 3)。测定不同质量浓度的儿茶酚黑色素的 $D_{217\text{ nm}}$, 并进行回归分析, 得到回归方程: $y=0.018\ 0x-0.018\ 3$, $R^2=0.997\ 7$ 。结果表明儿茶酚黑色素质量浓度与紫外吸光度有良好的线性关系。将培养 21 d 的 10 g 菌核充分干燥研磨成粉末状后提取和纯化黑色素, 测定其质量, 结果列于表 3。

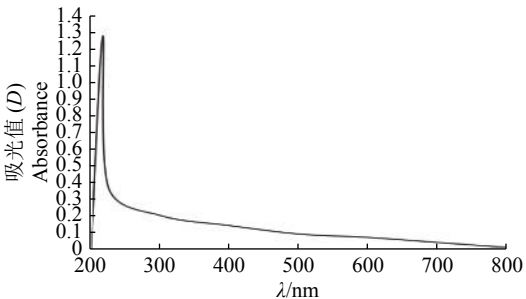


图 3 水稻纹枯病菌黑色素的紫外-可见光吸收光谱

Fig. 3 Ultraviolet-visible light absorption spectra of the melanin of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA

由表 3 可见, 在化学肥料组中, 与空白对照相比, 500 $\mu\text{g/mL}$ K_2SO_4 、 NaH_2PO_4 和 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 促进水稻纹枯病菌菌核黑色素的形成, 产生黑色素的质量排序为 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2>\text{NaH}_2\text{PO}_4>\text{K}_2\text{SO}_4$ 。

在金属离子组中, 与空白对照相比, 5 $\mu\text{g/mL}$ CuSO_4 和 ZnSO_4 促进水稻纹枯病菌菌核黑色素的形成, 5 $\mu\text{g/mL}$ FeSO_4 抑制水稻纹枯病菌菌核黑色素的形成, 产生黑色素的质量排序为 $\text{CuSO}_4>\text{ZnSO}_4>$

FeSO_4 。

在抗氧化剂组中, 与空白对照相比, 5 $\mu\text{g/mL}$ 槲皮素、桑色素和抗坏血酸均能促进水稻纹枯病菌菌核黑色素的形成, 产生黑色素的质量排序为桑色素>槲皮素>抗坏血酸。

在对照组中, 与空白对照相比, 莨菪碱抑制水稻纹枯病菌菌核黑色素的形成, 儿茶酚促进水稻纹枯病菌菌核黑色素的形成。

表 3 化学物质对水稻纹枯病菌黑色素产生的影响
Table 3 Effects of chemicals on the melanin formation of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA

组别 Group	化学物质 Chemical	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	$m(\text{黑色素})/\text{mg}$ Melanin mass
化学肥料 Chemical fertilizer	K_2SO_4	500	65.1
	NaH_2PO_4	500	85.5
	$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$	500	113.2
金属离子 Metal ion compound	CuSO_4	5	65.7
	ZnSO_4	5	59.5
	FeSO_4	5	44.3
抗氧化剂 Antioxidant	槲皮素 Quercetin	5	75.7
	桑色素 Morin	5	91.1
	抗坏血酸 Ascorbic acid	5	69.5
对照 Control	莨菪碱 Hyoscyamine	300	37.4
	儿茶酚 Catechol	50	55.7
	水 Water	0	46.2

3 结论与讨论

田间施用化学肥料对水稻纹枯病的影响已有较多研究。氮、磷、钾肥是水稻增产必不可少的肥料, 其含量也影响着水稻纹枯病菌的生长发育。Moromizato 等^[14]发现钾对水稻纹枯病病菌菌核形成的最适质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 。本研究中, 500 $\mu\text{g/mL}$ 的 K_2SO_4 和 NaH_2PO_4 能抑制水稻纹枯病菌丝的生长发育, 但 NaH_2PO_4 能促进水稻纹枯病菌菌核数量的增多, 而这有利于水稻纹枯病菌休眠体菌核的形成与传播; 500 $\mu\text{g/mL}$ 的 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 既促进了水稻纹枯病菌菌丝的生长, 也使得菌核数量增加, 说明氮肥的大量使用可能会造成水稻纹枯病的暴发, 与沈会芳等^[15]的研究结果一致。

在农业集约化的耕作模式下, 土壤中的金属离子会和植物病原菌发生协同或拮抗作用, 直接或者间接地影响病原菌的生长、繁殖以及致病力等, 从而对病害传播产生一定影响。刘力等^[16]研究表明立枯丝核菌不同融合群对微量元素的相对敏感性不同。Englander 等^[17]研究了 Cu^{2+} 等 17 种金属离子

对栗疫病菌 *Cryphonectria parasitica* 生长发育的影响; 刘杏忠等^[18]报道了 Hg^{2+} 等 6 种重金属离子对多种水霉的毒性。沈会芳等^[19]发现 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Fe^{2+} 能够影响水稻纹枯病菌的菌丝干质量, 且在含有 5 $\mu\text{g/mL}$ Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Fe^{2+} 的 PDA 中, 水稻纹枯病菌菌丝质量有所增加。在本研究中发现 5 $\mu\text{g/mL}$ 的 CuSO_4 和 FeSO_4 能促进水稻纹枯病菌菌丝的生长发育, 同时也促进菌核数量的增加; 而 5 $\mu\text{g/mL}$ 的 ZnSO_4 溶液抑制水稻纹枯病菌菌丝生长发育, 同时也抑制了水稻纹枯病菌菌核数量的增加, 结果对于防治水稻纹枯病具有参考意义。

微生物细胞分化的因素包括不稳定的超氧状态, 它能够诱导并促进自身分化^[17,20]。Georgiou 等^[21]研究表明植物病原真菌在菌核分化过程中会产生脂质氧化物, 并对氧化应激诱导的菌核分化机制提出了假说, 根据该假说通过增加抗氧化剂可以降低氧化胁迫的作用, 进而对菌核的生长发育产生影响。例如齐整小核菌 *Sclerotium rolfisii* 的菌核形成常常伴随着脂质氧化, 菌核是由活性氧引起的氧化

应激诱导产生的^[22]。对槲皮素、桑色素等抗氧化剂对水稻纹枯病菌菌核的形成影响进行研究, 结果发现不同浓度的抗氧化剂能够影响水稻纹枯病菌菌核的形成以及世代时间, 并且在 5 $\mu\text{g/mL}$ 槲皮素和桑色素诱导下, 水稻纹枯病菌菌核质量明显增多, 但是世代时间较为稳定^[23]。张传玉等^[24] 试验表明抗坏血酸可以消除氧化胁迫对不同水稻品种造成的伤害, 进而提高水稻的抗逆能力。目前少数植物病原真菌的菌核形成机制比较清楚, 而菌核分化可能是真菌抗氧化调节形成的, 抗坏血酸作为抗氧化剂通过调节脂质过氧化水平, 影响菌核发育阶段的分化能力^[25]。本研究结果表明, 5 $\mu\text{g/mL}$ 槲皮素和桑色素抑制水稻纹枯病菌菌丝生长的同时使得菌核数量增多, 有利于水稻纹枯病菌的传播; 而 5 $\mu\text{g/mL}$ 的抗坏血酸恰好相反, 促进水稻纹枯病菌菌丝生长的同时抑制水稻纹枯病菌菌核数量的增加, 可用来防止水稻纹枯病菌的扩散蔓延。

Abdel-motaal 等^[26] 的研究表明, 对于稻瘟病菌和立枯丝核菌, 1 $\mu\text{g/mL}$ 的苜蓿碱会引起菌丝体电解质的泄漏, 延缓或抑制真菌孢子萌发和附着胞的形成, 并且结果不可逆转; 400 $\mu\text{g/mL}$ 苜蓿碱处理时, 稻瘟病菌附着胞的死亡率约为 10%, 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 苜蓿碱处理时, 附着胞的死亡率约为 70%。儿茶酚作为一种抗氧化剂, 不仅能抗衰老, 同时还具有非常好的抗真菌效果。本研究中, 300 $\mu\text{g/mL}$ 的苜蓿碱能够促进水稻纹枯病菌菌丝生长和菌核的增加, 而 50 $\mu\text{g/mL}$ 儿茶酚溶液抑制水稻纹枯病菌菌丝生长的同时抑制水稻纹枯病菌菌核数量的增加。儿茶酚和苜蓿碱对水稻纹枯病菌菌核黑白表型的影响非常明显。

本研究中, 500 $\mu\text{g/mL}$ K_2SO_4 、 NaH_2PO_4 和 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 处理能有效促进水稻纹枯病菌黑色素的生成, 从而增强水稻纹枯病菌的抗逆性, 增强其对不良环境的适应性, 特别是 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 处理。大量施用氮肥容易加重水稻纹枯病的病害程度, 反映出在实际耕作中, 氮肥使用量不宜过多。5 $\mu\text{g/mL}$ 的 CuSO_4 和 ZnSO_4 处理有利于黑色素的形成, 而 5 $\mu\text{g/mL}$ 的 CuSO_4 处理虽然菌核质量减少, 但数量增多; 5 $\mu\text{g/mL}$ 的 ZnSO_4 处理不仅抑制水稻纹枯病菌菌丝的生长发育, 同时也抑制水稻纹枯病菌菌核数量和质量的增加, 说明 ZnSO_4 对水稻纹枯病菌的抑制作用强于 CuSO_4 。当水稻纹枯病菌菌体受到金属离子胁迫时, 由于自身保护作用, 反而促进水稻纹枯病菌黑色素的分泌, 增强其对外界不良环境的抗逆性, 而 5 $\mu\text{g/mL}$ 的 FeSO_4 处理能促进水稻纹枯

病菌菌核数量的增加, 但对黑色素的形成有抑制作用, 降低了水稻纹枯病菌对环境的适应能力。5 $\mu\text{g/mL}$ 抗坏血酸能抑制水稻纹枯病菌菌核数量的增长, 但却促进水稻纹枯病菌菌核黑色素的形成, 而 5 $\mu\text{g/mL}$ 槲皮素、桑色素能促进水稻纹枯病菌菌核数量的增加, 有利于水稻纹枯病菌的传播, 并且促进水稻纹枯病菌菌核黑色素的形成, 可以提高水稻纹枯病菌抗逆能力。300 $\mu\text{g/mL}$ 苜蓿碱能促进水稻纹枯病菌菌丝生长和菌核数量增加, 但是抑制黑色素的形成; 而 50 $\mu\text{g/mL}$ 的儿茶酚不仅抑制水稻纹枯病菌菌丝生长, 也抑制水稻纹枯病菌菌核数量的增加, 但可以促进水稻纹枯病菌黑色素的形成。

本研究结果表明不同化学物质对水稻纹枯病菌菌丝的生长速率、菌核数量、菌核大小、菌核鲜质量和干质量以及黑色素产生的影响程度不同。抑制水稻纹枯病菌菌丝和菌核生长发育的化学物质, 不一定抑制水稻纹枯病菌菌核生长发育。500 $\mu\text{g/mL}$ K_2SO_4 、 NaH_2PO_4 和 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, 5 $\mu\text{g/mL}$ CuSO_4 和 ZnSO_4 , 5 $\mu\text{g/mL}$ 槲皮素、桑色素和抗坏血酸以及 50 $\mu\text{g/mL}$ 的儿茶酚溶液对黑色素的形成均有促进作用, 而 5 $\mu\text{g/mL}$ FeSO_4 和 300 $\mu\text{g/mL}$ 苜蓿碱处理对黑色素形成有抑制作用, 这为水稻纹枯病菌在不同环境中的适应性提供了理论依据。

参考文献:

[1] ELAD Y. The use of antioxidants (free radical scavengers) to control grey mould (*Botrytis cinerea*) and white mould (*Sclerotinia sclerotiorum*) in various crops[J]. *Plant Pathol*, 1992, 41(4): 417-426.

[2] TOWNSEND B B. Nutritional factors influencing the production of sclerotia by certain fungi[J]. *Ann Bot*, 1957, 21(81): 153-166.

[3] 曹志艳, 杨胜勇, 董金皋. 植物病原真菌黑色素与致病性关系的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2006, 33(1): 154-158.

[4] REVANKAR S G, SUTTON D A. Melanized fungi in human disease[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2010, 23(4): 884.

[5] 江绍锋, 王陈骄子, 舒灿伟, 等. 水稻纹枯病菌 *Rscat* 基因的克隆及其表达分析[J]. *华中农业大学学报*, 2018, 37(3): 25-31.

[6] BELOZERSKAYA T A, GESSLER N N, AVER YANOV A A. Melanin pigments of fungi[M]. Berlin: Springer International Publishing, 2015.

[7] MISHRA S, SINGH H B. Silver nanoparticles mediated altered gene expression of melanin biosynthesis genes in *Bipolaris sorokiniana*[J]. *Microbiol Res*, 2015, 172(64): 16-18.

- [8] JIANG S, WANG C, SHU C, et al. Effects of catechol on growth, antioxidant enzyme activities and melanin biosynthesis gene expression of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA[J]. *Can J Plant Pathol*, 2018, 40(2): 220-228.
- [9] FENG B, WANG X, HAUSER M, et al. Molecular cloning and characterization of *WdPKS1*, a gene involved in dihydroxynaphthalene melanin biosynthesis and virulence in *Wangiella (Exophiala) dermatitidis*[J]. *Infect Immun*, 2001, 69(3): 1781.
- [10] 江绍锋, 王陈骄子, 舒灿伟, 等. 水稻纹枯病菌 *RsPhm* 基因的克隆及其表达分析[J]. 中国水稻科学, 2018, 32(2): 111-118.
- [11] YANG Y Q, YANG M, LI M H, et al. Cloning and functional analysis of an endo-PG-encoding gene *Rrspgl* of *Rhizoctonia solani*, the causal agent of rice sheath blight[J]. *Can J Plant Pathol*, 2012, 34(3): 436-447.
- [12] 方中达. 植病研究方法[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998: 46.
- [13] CHEN J, WANG C, SHU C, et al. Isolation and characterization of a melanin from *Rhizoctonia solani*, the causal agent of rice sheath blight[J]. *Eur J Plant Pathol*, 2015, 142(2): 281-290.
- [14] MOROMIZATO Z, MATSUYAMA N, WAKIMOTO S. The effect of amino acids on sclerotium formation of *Rhizoctonia solani* Kühn (AG-1) I: Inhibition of sclerotial formation by various amino acids[J]. *Jap J Plant Pathol*, 1980, 46(1): 15-20.
- [15] 沈会芳, 周而勋, 戚佩坤. 化学肥料对水稻纹枯病菌菌丝生长和菌核形成的影响[J]. 华南农业大学学报, 2002, 23(2): 94.
- [16] 刘力, 葛起新. 立枯丝核菌融合群对四种微量元素敏感性的研究[J]. 植物病理学报, 1988, 18(3): 175-178.
- [17] ENGLANDER C M, CORDEN M E. Stimulation of mycelial growth of *Endothia parasitica* by heavy metals[J]. *Appl Microbiol*, 1971, 22(6): 1012-1016.
- [18] 刘杏忠, 沈崇尧, 裘维蕃. 重金属离子对一些水霉的毒性[J]. 植物病理学报, 1989, 19(3): 173-177.
- [19] 沈会芳, 周而勋, 戚佩坤. 金属离子对水稻纹枯病菌菌丝生长和菌核形成的影响[J]. 华南农业大学学报, 2002, 23(1): 38-40.
- [20] WANG C, PI L, JIANG S, et al. ROS and trehalose regulate sclerotial development in *Rhizoctonia solani* AG-1 IA[J]. *Fungal Biol*, 2018, 122(5): 322-332.
- [21] GEORGIOU C D, ZEES A. Lipofuscins and sclerotial differentiation in phytopathogenic fungi[J]. *Mycopathologia*, 2002, 153(4): 203-208.
- [22] GEORGIOU C D. Lipid peroxidation in *Sclerotium rolfsii*: A new look into the mechanism of sclerotial biogenesis in fungi[J]. *Mycol Res*, 1997, 101(4): 460-464.
- [23] LU L, SHU C, LIU C, et al. The impacts of natural antioxidants on sclerotial differentiation and development in *Rhizoctonia solani* AG-1 IA[J]. *Eur J Plant Pathol*, 2016, 146(4): 729-740.
- [24] 张传玉, 张执金, 黄荣峰, 等. 水稻品种中 VC 含量及抗氧化性的比较分析[J]. 中国农业科技导报, 2011, 13(6): 6-11.
- [25] GEORGIOU C D, ZERVOUDAKIS G, PETROPOULOU K P. Ascorbic acid might play a role in the sclerotial differentiation of *Sclerotium rolfsii*[J]. *Mycologia*, 2003, 95(2): 308-316.
- [26] ABDEL-MOTAAL F F, EL-ZAYAT S A, KOSAKA Y, et al. Antifungal activities of hyoscyamine and scopolamine against two major rice pathogens: *Magnaporthe oryzae* and *Rhizoctonia solani*[J]. *J Gen Plant Pathol*, 2010, 76(2): 102-111.

【责任编辑 霍 欢】