

挥发性化合物 2-甲基苯并噻唑对核盘菌和灰葡萄孢的抑制效应

扈景晗¹ 王 东^{1,2} 东保柱^{1,2} 孟焕文¹ 赵 君^{1,2} 周洪友^{1,2*}

(1. 内蒙古农业大学园艺与植物保护学院, 呼和浩特 010020;

2. 内蒙古寒旱区作物保护工程技术中心, 呼和浩特 010020)

摘要: 为明确挥发性化合物 2-甲基苯并噻唑(2-methylbenzothiazole, 2-MBTH)对向日葵菌核病原菌核盘菌 *Sclerotinia sclerotiorum* 和番茄灰霉病原菌灰葡萄孢 *Botrytis cinerea* 的防治潜力, 采用密封盘菌丝生长速率法测定其对 2 种病原菌的抑制作用, 利用离体叶片接种试验分析其对 2 种病原菌致病力的影响。结果显示, 2-MBTH 对核盘菌和灰葡萄孢具有明显的抑制作用, 2-MBTH 对核盘菌菌丝的 EC_{50} 为 0.87 $\mu\text{L/L}$, 对灰葡萄孢菌丝的 EC_{50} 为 4.49 $\mu\text{L/L}$ 。2-MBTH 能够显著降低灰葡萄孢的致病力, 受抑制程度与 2-MBTH 浓度呈正相关; 扫描电镜观察发现, 2-MBTH 能够使灰葡萄孢菌丝形态异常, 菌丝干瘪, 分枝增多, 表面塌陷; 使核盘菌菌丝破损, 表面塌陷。另外, 随着 2-MBTH 熏蒸浓度的增大, 核盘菌的菌核数量和质量都有所减少, 且健康菌核在 2-MBTH 的熏蒸作用下失去了萌发能力。表明 2-MBTH 对核盘菌和灰葡萄孢均有较高的抑制作用, 表现为菌丝生长、菌核萌发受到抑制, 利用其熏蒸作用可以为向日葵菌核病和番茄灰霉病的有效防控提供新思路。

关键词: 2-甲基苯并噻唑; 向日葵菌核病; 番茄灰霉病; 抑制效应

The inhibitory effect of the volatile compound 2-methyl benzothiazole on pathogenic fungi *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*

Hu Jinghan¹ Wang Dong^{1,2} Dong Baozhu^{1,2} Meng Huanwen¹ Zhao Jun^{1,2} Zhou Hongyou^{1,2*}

(1. College of Horticulture and Plant Protection, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010020, Inner Mongolia Autonomous Region, China; 2. Inner Mongolia Cold and Arid Region Crop Protection Engineering Technology Center, Hohhot 010020, Inner Mongolia Autonomous Region, China)

Abstract: In order to evaluate the biocontrol potentiality of the volatile compound 2-methylbenzothiazole (2-MBTH) to pathogenic fungi *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*, its effects on mycelium growth rate were determined on PDA plates and its influence on the pathogenicity of the two pathogens was analyzed via *in vitro* leaf inoculation. The results showed that 2-MBTH had obvious inhibitory effects on the mycelium growth of *S. sclerotiorum* and *B. cinerea*. The EC_{50} of 2-MBTH on the mycelium growth of *S. sclerotiorum* and *B. cinerea* were 0.87 $\mu\text{L/L}$ and 4.49 $\mu\text{L/L}$, respectively. Fumigation with 2-MBTH could significantly reduce the pathogenicity of *B. cinerea*, and the degree of inhibition was positively correlated with the concentration of 2-MBTH. Results of scanning electron microscope observation showed that 2-MBTH could lead to pits on the hyphal surface, and increased hyphal branches of *S. sclerotiorum* and *B. cinerea*. In addition, it was found that the increase of fumigation concentration with 2-MBTH could reduce the number and weight of sclerotia formed by *S. sclerotiorum* on PDA plates, and normal healthy sclerotia could lose their ability to germinate after treatment with 2-MBTH.

基金项目: 国家自然科学基金(31260445, 31960533), 国家重点研发计划(2017YFD0201101)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: hongyouzhou2002@aliyun.com

收稿日期: 2020-08-19

These results indicated that 2-MBTH was highly inhibitory to both *S. sclerotiorum* and *B. cinerea*, and exhibited a promising potential to be used as a fumigant for controlling sunflower sclerotium blight and tomato grey mould.

Key words: 2-methylbenzothiazole; sunflower sclerotium blight; tomato grey mould; antifungal effect

菌核是一些真菌发育到一定阶段,相互纠结在一起形成的一种颜色较深的坚硬菌丝体组织,能够经受各种不利的自然环境,且存活期长达8年之久(Adams, 1979),可以在病株残体、种子或土壤中越冬越夏,成为次年的侵染源。现已发现许多丝状真菌均可以形成菌核或微菌核(Boland & Hall, 1994)。向日葵菌核病是由核盘菌 *Sclerotinia sclerotiorum* 引起的气传和土传病害,给向日葵产业带来了巨大的经济损失(王静等, 2006)。该菌菌核在土壤中越冬,于次年在适宜气候条件下萌发出子囊盘,子囊成熟后弹射出大量的子囊孢子,子囊孢子随气流或雨水传播并侵染向日葵植株(Dean et al., 2012)。菌核是病原菌越冬的主要组织(Bloomfield & Alexander, 1967)。灰霉病是由灰葡萄孢 *Botrytis cinerea* 引起的世界性病害(Boland & Hall, 1987),而灰葡萄孢主要以菌核、菌丝体或分生孢子越冬,翌年在适宜条件下借助空气、雨水以及农事操作等途径侵染植物,造成严重危害(赵杨等, 2014)。此外,灰霉病也是多种蔬菜、水果的贮藏期的主要病害(喻最新等, 2018)。

目前,防治土传病害主要采用农业措施,如轮作、选用抗病品种等。但由于核盘菌和灰葡萄孢的菌核可以在土壤中长期存活,而且寄主广泛,并缺乏抗性材料,侵染所致病害的防控效果均不理想(李国庆等, 1997)。化学杀菌剂是防治真菌病害的主要措施之一,但土壤处理难度大且化学杀菌剂的应用会导致环境和土壤生态被污染和破坏(Fernando et al., 2005)。近年来,生物防治因其污染小、对环境友好而得到了广泛关注(Minuto et al., 2006)。生物防治的主要机理有抗生、重寄生和诱导抗性等(李全胜等, 2018)。其中,枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* 是一种能够产生多种抗生素的革兰氏阳性杆状细菌(周翠等, 2011),其次级代谢产物如脂肽类化合物有良好的抗真菌活性,在防治植物病害中发挥着重要作用(董伟欣等, 2013)。抗生素中的挥发性化合物有很好的生物熏蒸作用,对于调整土壤中的微生物群落结构、降低有害生物量有重要作用,其中枯草芽胞杆菌所产生的挥发性化合物对葡萄座腔菌 *Botryosphaeria dothidea*、葡萄白腐垫壳孢菌 *Coniothyrium diplodiella*、杨树污黑腐皮壳菌 *Valsa sordida*、桑卷担子菌 *Helicobasidium purpureum*、尖孢镰刀菌

Fusarium oxysporum 和粉红聚端孢菌 *Trichothecium roseum* 等多种病原菌具有较好的抑制作用(Rajer et al., 2017)。枯草芽胞杆菌菌株 CF-3 发酵液中的挥发性化合物可抑制灰葡萄孢、炭疽杆菌 *Colletotrichum gloeosporioides*、扩展青霉 *Penicillium expansum*、链核盘菌 *Monilinia fructicola* 和链格孢 *Alternaria alternata* 的菌丝生长(Gao et al., 2018)。枯草芽胞杆菌菌株 X 和解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens* 菌株 B1、HB-2 发酵液产生的挥发性气体对链格孢菌落的扩展有明显抑制作用(郑香香等, 2019)。这些芽胞杆菌表现出的生防活性往往是由其产生的挥发性化合物带来,而挥发性化合物可以抑制病原菌生长或诱导植物产生抗性(Kai et al., 2009; Sumayo et al., 2013),其中,壬醛、2-十一烷酮、环己醇、正癸醛、苯并噻唑、2-乙基己醇、2-甲基吡嗪和二甲基三硫醚等具有生物防治活性(Tahir et al., 2017; Xie et al., 2018)。

本课题组前期从土壤中分离得到1株具有高拮抗活性的枯草芽胞杆菌菌株 S-16,该菌能产生挥发性化合物,可以抑制向日葵菌核病原菌和番茄灰霉病原菌的菌丝生长和菌核形成(张一名, 2010)。利用气相色谱-质谱联用仪从菌株 S-16 产生的挥发性化合物中检测鉴定出43种,其中2-甲基苯并噻唑是挥发性化合物中的主要成分之一(王祺, 2014)。本研究以向日葵菌核病原菌与番茄灰霉病原菌为靶标,观察并分析该挥发性化合物对这2种病原菌的抑制作用,以期阐明挥发性化合物2-MBTH的抑菌机理和绿色防控向日葵菌核病与番茄灰霉病提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株:灰葡萄孢分离自感灰霉病番茄病株,核盘菌分离自感菌核病向日葵病株,2株病原菌由内蒙古农业大学园艺与植物保护学院生物农药研究室保存并提供。

供试植物:向日葵品种为 LD5009,番茄品种为红宝石,种子均由内蒙古农业大学园艺与植物保护学院生物农药研究室保存并提供。将2种植物种子表面消毒后,分别种植在直径10 cm的营养钵中,在

25℃、光照16 h/黑暗8 h条件下培养5周后,分别取向日葵幼苗和番茄幼苗的第3~7片叶用无菌蒸馏水冲洗干净,0.5% NaClO溶液消毒1 min,无菌蒸馏水冲洗3次后,自然晾干,备用。

马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基:马铃薯200 g、琼脂20 g、葡萄糖20 g、去离子水1 L。

试剂和仪器:2-甲基苯并噻唑(2-methylbenzothiazole, 2-MBTH),上海麦克林生化科技有限公司;电镜固定液,武汉赛维尔生物科技有限公司;其余试剂均为国产或进口分析纯。Leica UC7超薄切片机,德国Leica公司;Ultra 45°钻石切片刀,美国Daitome公司;SU8100扫描电子显微镜、HT7800/HT7700透射电子显微镜和MC1000离子溅射仪,日本Hitachi公司;0.119 mm孔径方华膜铜网,武汉赛维尔生物科技有限公司;K850临界点干燥仪,英国Quorum公司。

1.2 方法

1.2.1 2-MBTH对核盘菌及灰葡萄孢的抑制活性测定

用密封盘菌丝生长速率法测定2-MBTH对核盘菌及灰葡萄孢的抑制活性(苗建强等,2012)。将2种病原菌在PDA平板上于25℃暗培养3 d,并在4℃保存备用。在活化3 d的2种病原菌菌落边缘打取直径为5 mm的菌饼,接入PDA平板中央,定量移取0.05、0.1、0.2、0.4、0.8和1.6 μL的2-MBTH滴加到皿盖上,迅速密封,熏蒸体积均为100 mL,熏蒸浓度分别为0.5、1、2、4、6、8和16 μL/L,以皿盖上滴加相应用量无菌水为对照。用封口膜密封并于25℃倒置暗培养,每个浓度处理4次重复。待空白对照菌落直径生长至培养皿直径的2/3时,采用十字交叉法测定菌落直径,并计算2-MBTH对供试菌株菌丝的生长抑制率和 EC_{50} 。抑制率=(对照组菌落直径-处理组菌落直径)/对照组菌落直径×100%。

1.2.2 2-MBTH对核盘菌及灰葡萄孢致病力的影响测定

采用密封盘法对培养24 h的核盘菌和灰葡萄孢利用2-MBTH熏蒸处理48 h,病原菌培养方法和2-MBTH熏蒸方法同1.2.1。参照Liu et al.(2009)离体叶片接种法,将直径为5 mm的核盘菌和灰葡萄孢菌饼分别接种于向日葵和番茄的叶片正面。在每片叶上接1个菌饼,每个浓度处理接种3片叶。接种后于温度25℃、光照12 h/黑暗12 h、相对湿度85%条件下培养3 d后,用十字交叉法测量病斑直径,并计算2-MBTH对供试菌株致病力的抑制率。致病力抑制率=(对照组病斑直径-处理组病斑直径)/对照组病斑直径×100%。

1.2.3 2-MBTH对核盘菌菌核萌发的影响

将核盘菌在PDA平板上于25℃暗培养7 d后,收集大小均匀一致的成熟菌核,用75%酒精进行表面消毒后置于培养皿内,每皿5粒。2-MBTH熏蒸处理浓度设为1、2、4、8和16 μL/L,于25℃下暗培养3 d后检查菌核萌发情况,每个浓度处理3次重复。

1.2.4 2-MBTH对核盘菌菌核生长发育的影响

将核盘菌在PDA平板上于25℃暗培养3 d后,用浓度为0.5、1、2、4、8、16和32 μL/L的2-MBTH进行熏蒸处理,方法同1.2.1,对照PDA平板不加2-MBTH,每个浓度处理3次重复。封口膜密封皿口,于25℃下暗培养11 d后,从培养皿中收集菌核,统计测定菌核的数量和质量。

1.2.5 2-MBTH处理后核盘菌菌核内部超微结构观察

用解剖刀将1.2.4收集到的核盘菌菌核切成厚度约为1 mm的薄片,用5 μL/L 2-MBTH熏蒸48 h,以不经2-MBTH处理的为对照组,方法同1.2.1。收集处理后的菌核,用戊二醛溶液于4℃固定12 h,加入0.1 mol/L磷酸缓冲液,混匀漂洗3 min后在常温下以3 000 r/min离心,重复洗涤3次。提前制备1%琼脂糖溶液加入EP管内,凝固之前将菌核用镊子挑起悬浮包裹于琼脂糖内。在用0.1 mol/L磷酸缓冲液配制的1%锇酸中避光室温固定2 h后,经0.1 mol/L磷酸缓冲液漂洗3次,每次15 min;依次经30%、50%、70%、80%、95%和100%酒精逐级各脱水20 min,100%丙酮脱水2次,每次15 min。然后于37℃下在丙酮和812包埋剂体积比1:1混合液中渗透4 h,再在丙酮和812包埋剂体积比1:2混合液中渗透过夜,最后在纯812包埋剂中渗透5 h。将纯812包埋剂倒入包埋板,将样品插入包埋板后于37℃烤箱中过夜后,在60℃烤箱中聚合48 h,取出树脂块备用。树脂块用超薄切片机切片,厚度为60 nm,用孔径为0.119 mm的方华膜铜网捞片。铜网于2%醋酸铀饱和酒精溶液中避光染色8 min后,70%酒精清洗3次,超纯水清洗3次;再于2.6%枸橼酸铅溶液避二氧化碳染色8 min后,超纯水清洗3次,滤纸稍吸干。铜网切片放入铜网盒内室温干燥过夜,在透射电子显微镜下观察并采集图像。每处理3次重复。

1.2.6 2-MBTH对核盘菌和灰葡萄孢菌丝形态的影响

用5 μL/L 2-MBTH对培养24 h的核盘菌和灰葡萄孢熏蒸48 h,以无2-MBTH处理的菌丝作对照,方法同1.2.1。取边缘菌丝迅速投入电镜固定液中并于室温下固定2 h,再转移至4℃保存。固定好的样品经0.1 mol/L磷酸缓冲液漂洗3次,每次15 min。在以0.1 mol/L磷酸缓冲液配制的1%锇酸中室温避

光固定2 h。0.1 mol/L 磷酸缓冲液漂洗3次,每次15 min,然后依次置于30%、50%、70%、80%、95%和100%酒精中逐级各脱水15 min,再经乙酸异戊酯脱水15 min。将样本放入临界点干燥仪内进行干燥后,取出后紧贴于导电碳膜双面胶上放入离子溅射仪样品台上进行喷金30 s,扫描电子显微镜下观察。每处理3次重复。

1.3 数据分析

利用DPS 7.05软件对试验数据进行统计分析,应用Duncan氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 2-MBTH对核盘菌和灰葡萄孢的抑制活性

核盘菌和灰葡萄孢对2-MBTH均很敏感,且2-MBTH对2种病原菌的抑制率均随着浓度的升高而增加。当熏蒸浓度为16 $\mu\text{L/L}$ 时,2-MBTH对核盘菌和灰葡萄孢的菌丝生长抑制率分别达87.50%和76.73%(图1)。2-MBTH对核盘菌菌丝的 EC_{50} 为0.87 $\mu\text{L/L}$,对灰葡萄孢菌丝的 EC_{50} 为4.49 $\mu\text{L/L}$ 。

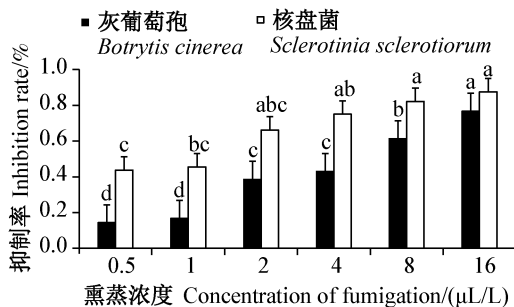


图1 2-甲基苯并噻唑对核盘菌和灰葡萄孢菌丝生长的影响

Fig. 1 Effects of 2-methylbenzothiazole on the mycelium growth of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*

图中数据均为平均数±标准差。同色柱上不同小写字母表示经Duncan氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SD. Different lowercase letters on the same color bars indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

2.2 2-MBTH对核盘菌和灰葡萄孢致病力的影响

随着2-MBTH熏蒸浓度的升高,核盘菌在向日葵叶片上的病斑面积逐渐缩小。0.5 $\mu\text{L/L}$ 熏蒸浓度处理对核盘菌和灰葡萄孢致病力的抑制率分别为20.95%和12.38%,16 $\mu\text{L/L}$ 熏蒸浓度处理对核盘菌和灰葡萄孢致病力的抑制率则分别升高至80.00%和68.57%,病斑面积随着2-MBTH熏蒸浓度的升高而缩小(图2)。表明2-MBTH对核盘菌和灰葡萄孢具有明显的抑制作用,可延缓番茄灰霉病和向日葵菌核病的病斑扩展。

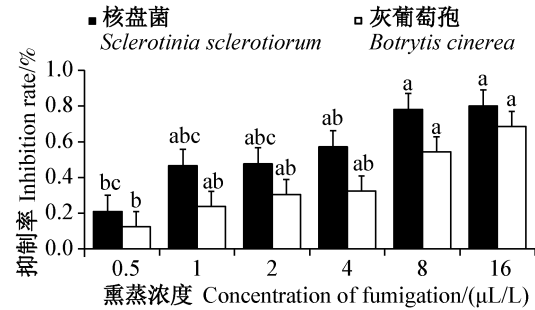


图2 2-甲基苯并噻唑对核盘菌和灰葡萄孢致病力的影响

Fig. 2 Effects of 2-methylbenzothiazole on the pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*

图中数据均为平均数±标准差。同色柱上不同小写字母表示经Duncan氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SD. Different lowercase letters on the same color bars indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

2.3 2-MBTH对核盘菌菌核萌发的影响

经不同浓度2-MBTH处理核盘菌菌核3 d后,置于PDA培养基上培养,对照菌核全部萌发且菌丝布满整个培养皿,而16 $\mu\text{L/L}$ 2-MBTH熏蒸浓度处理组的菌核均没有萌发,表明16 $\mu\text{L/L}$ 浓度的2-MBTH能够完全抑制核盘菌菌核的萌发(图3)。1、2、4和8 $\mu\text{L/L}$ 浓度2-MBTH处理后的核盘菌菌核可以萌发,但在菌丝的生长速率上产生了明显差异,表明2-MBTH对核盘菌菌核萌发具有明显的抑制作用。

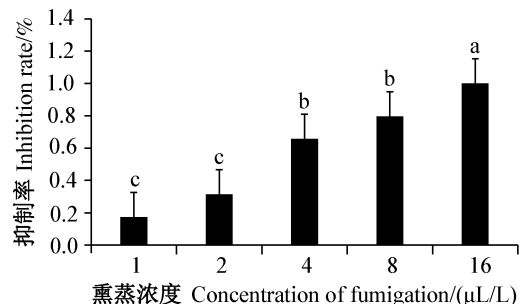


图3 2-甲基苯并噻唑对核盘菌菌核萌发的影响

Fig. 3 Effect of 2-methylbenzothiazole on the germination of *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia

图中数据均为平均数±标准差。不同小写字母表示经Duncan氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SD. Different lowercase letters indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

2.4 2-MBTH对核盘菌菌核生长发育的影响

2-MBTH对核盘菌菌核形成有明显的抑制作用,随着熏蒸浓度的升高,菌核数量较对照显著降低(图4-A),菌核质量也明显下降,在8~32 $\mu\text{L/L}$ 浓度处理下显著低于对照(图4-B)。且2-MBTH处理后核盘菌菌核的物理性质也发生了明显变化,随着熏蒸浓

度的增加,菌核由硬变软且易变形,颜色由深变浅,菌核表面变褐,丧失萌发能力;而对照组菌核具清晰

的黑色外层和白色髓部(图4-C)。表明2-MBTH熏蒸处理会导致核盘菌菌核的物理性质发生很大变化。

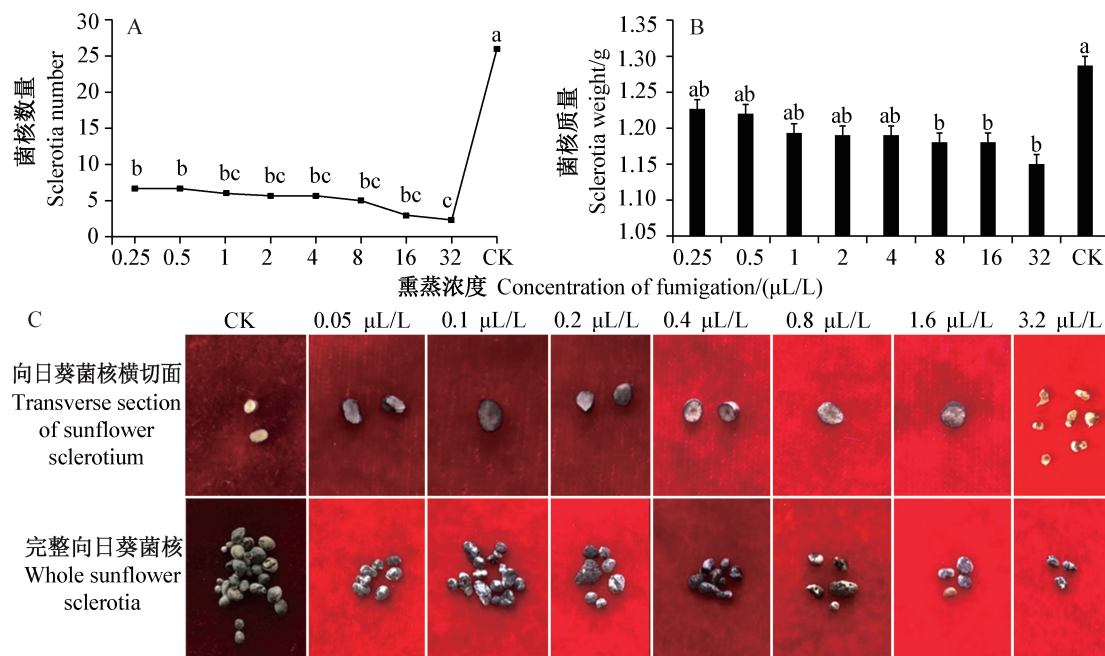


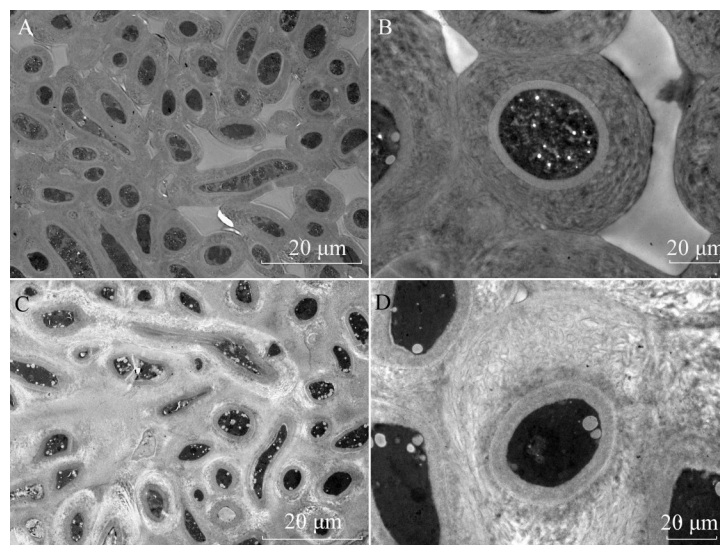
图4 2-甲基苯并噻唑对核盘菌菌核萌发数量(A)、质量(B)和发育(C)的影响

Fig. 4 Effects of 2-methylbenzothiazole on number (A), weight (B) and development (C) of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*

2.5 2-MBTH对核盘菌菌核内部超微结构的影响

透射电镜下观察发现对照核盘菌菌核内部结构正常,菌丝呈粗细不等的长管状,细胞结构清晰、完整,细胞壁、细胞膜完整,且厚薄均匀;胞浆丰富均匀,细胞质电子密度均匀一致,可见弯曲分隔,细胞器内可见线粒体、细胞核等细胞器,可见少量脂滴、液泡;细胞内也可见线粒体、脂滴、空泡、细胞核等(图5-A~B)。经过2-MBTH熏蒸处理后,核盘菌菌

丝体细胞变形,出现多个斑片状电子薄区;细胞壁、细胞膜连续性中断,结构模糊,且厚薄不均;胞浆内电子密度不均,细胞质偏于一侧;细胞浆边缘空泡,脂滴增多,细胞器肿胀,胞壁及细胞膜被溶解破坏,细胞浆内基质水肿稀疏明显,部分线粒体变形、破损,液泡、脂滴增多(图5-C~D)。表明经过2-MBTH熏蒸处理后核盘菌菌核的结构受到了破坏,各细胞结构紊乱。



A~B: 对照组; C~D: 2-甲基苯并噻唑处理组。A~B: The control group; C~D: the 2-methylbenzothiazole treatment group.

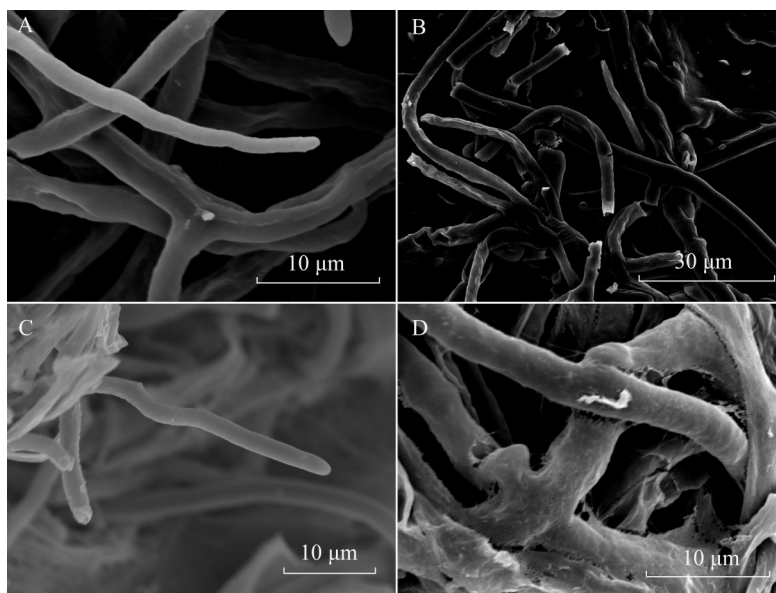
图5 2-甲基苯并噻唑处理后核盘菌菌核内部的超微结构

Fig. 5 Ultrastructures of the sclerotia inside of *Sclerotinia sclerotiorum* treated with 2-methylbenzothiazole

2.6 2-MBTH对核盘菌和灰葡萄孢菌丝形态的影响

利用扫描电子显微镜观察菌丝表面结构,对照组核盘菌的菌丝形态完整,表面细滑,线条流畅(图6-A);而5 $\mu\text{L/L}$ 2-MBTH熏蒸处理48 h后,核盘菌的菌丝破损,表面干瘪,菌丝末端膨大,分枝增多,表面有塌陷(图6-B)。对照组灰葡萄孢的菌丝生长繁

茂,平滑修长,菌丝分隔明显,生长状态良好(图6-C);而5 $\mu\text{L/L}$ 2-MBTH熏蒸处理48 h后,部分灰葡萄孢的菌丝变粗或变纤细,表现出不同程度的扭曲、肿胀,内部原生质泄露(图6-D)。表明2-MBTH熏蒸处理破坏了核盘菌和灰葡萄孢的菌丝结构,影响了2种病原菌的正常菌丝形态与生物活性。



A~B: 对照组和处理组核盘菌菌丝; C~D: 对照组和处理组灰葡萄孢菌丝。A~B: Mycelia of the *S. sclerotiorum* control group and the treatment group; C~D: mycelia of *B. cinerea* control group and treatment group.

图6 2-甲基苯并噻唑对核盘菌(A~B)和灰葡萄孢(C~D)菌丝形态的影响

Fig. 6 Effects of 2-methylbenzothiazole on mycelial morphology of *Sclerotinia sclerotiorum* (A~B) and *Botrytis cinerea* (C~D)

3 讨论

挥发性化合物具有残留量低、安全性高和防效好的特点(Mercier & Smilanick, 2005)。盘状螺旋蓝细菌 *Spirulina platensis*、芽胞杆菌均能产生挥发性有机化合物,这些化合物对于由灰葡萄孢和核盘菌引起的作物病害有显著防效(Kishimoto et al., 2007; Wan et al., 2008)。本研究结果表明,枯草芽胞杆菌菌株 S-16 挥发性化合物 2-MBTH 对这2种病原菌的菌丝生长和菌核形成有明显的抑制作用,说明生防细菌产生的各类挥发性化合物是其重要的抑菌物质。

虽然有很多研究验证了生防菌产生的挥发性化合物的生防潜力,但有关挥发性化合物生防机理的研究较少。目前,杀菌剂的作用靶标多种多样,如干扰有丝分裂中的纺锤体形成,进而影响细胞分裂;干扰呼吸作用,进而阻碍能量代谢等(亦冰, 2006; 韩君等, 2011)。本研究发现挥发性化合物 2-MBTH 能够明显抑制真菌的菌丝生长和菌核形成,进而影响其

对植物的致病力与抗逆性,且通过扫描电镜和透射电镜观察发现,2-MBTH熏蒸处理对于菌核内部菌丝形态、胞质分布、生长菌丝表面结构均有明显影响。2-MBTH熏蒸作用导致的菌丝内部及表面的结构和生理变化是其影响病原菌菌核形成及萌发的重要原因。

2-MBTH是苯并噻唑的衍生物,苯并噻唑是一种微黄色液体状的化合物,分子式是 $\text{C}_7\text{H}_5\text{NS}$,呈喹啉似气味(崔凯娣等, 2017);且对菌核病、韭菜迟眼蕈蚊 *Bradysia odoriphaga* 和根结线虫 *Meloidogyne* 等病虫害都具有较好的防治效果(Fernando et al., 2005; Liu et al., 2009; 陈澄宇等, 2014),具有开发为土壤熏蒸剂的潜力。Ginsberg et al. (2011)推测苯并噻唑是一种呼吸刺激剂,与能量代谢有关,但具体作用机制仍待进一步深入研究。菌核是真菌糖类和脂类的储存体,其形成和萌发与脂类、糖类代谢密切相关(崔凯娣等, 2017)。本研究结果表明,2-MBTH使菌核的菌丝体细胞变形,细胞浆内边缘空泡,脂滴增多,说明菌核形成过程中脂类的合成、代谢等受到了

影响,推测2-MBTH处理影响了病原菌菌丝内部的脂类合成与代谢,从而导致菌丝内部结构被破坏,菌核的形成和萌发受到了影响,表明当菌核内部的脂滴增多,其萌发的营养条件受到破坏时,菌核无法萌发。另一方面,2-MBTH处理会使菌丝表面塌陷,表面结构不完整,推测2-MBTH还会影响菌丝内一些细胞壁、细胞膜和原生质整体结构的合成,导致菌丝表面结构不完整,形成了菌丝表面的塌陷(陈利军等, 2020);或2-MBTH处理后造成病原菌细胞膜破损,胞质外漏,致使菌丝干瘪。但是2-MBTH具体作用于菌丝生长发育中的哪个生理过程及其抑菌机理还需进一步研究确定。

本课题组前期研究中发现枯草芽孢杆菌产生的挥发性化合物能抑制核盘菌菌丝生长,进一步通过单一组分化合物的抑菌试验筛选得到对病原菌抑制作用明显的一种化合物2-MBTH,且证明了2-MBTH是这组挥发性化合物中的主要成分之一(张一名, 2010;王祺, 2014)。本研究结果进一步表明,2-MBTH对核盘菌和灰葡萄孢均有较高的抑制能力,作为一种挥发性化合物,2-MBTH更适用于温室大棚、仓储等密闭环境中病害的防治,其使用方法和效果尚需进一步评价。

参 考 文 献 (References)

- Adams PB. 1979. Ecology of *Sclerotinia* species. *Phytopathology*, 69(8): 896
- Bloomfield BJ, Alexander M. 1967. Melanins and resistance of fungi to lysis. *Journal of Bacteriology*, 93(4): 1276–1280
- Boland GJ, Hall R. 1987. Epidemiology of white mold of white bean in Ontario. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 9(3): 218–224
- Boland GJ, Hall R. 1994. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 16(2): 93–108
- Chen CY, Zhao YH, Li H, Zhang P, Mu W, Liu F. 2014. Biological activity of benzothiazole against *Bradysia odoriphaga* (Diptera: Sciaridae) at different developmental stages. *Acta Entomologica Sinica*, 57(1): 45–51 (in Chinese) [陈澄宇, 赵云贺, 李慧, 张鹏, 慕卫, 刘峰. 2014. 苯并噻唑对不同虫态韭菜迟眼蕈蚊的生物活性. *昆虫学报*, 57(1): 45–51]
- Chen LJ, Zhi YN, Wang CS, Chen JZ, Jin YL, Chen YH. 2020. Analysis of the fumigation inhibition mechanism of essential oil from *Chenopodium ambrosioides* against the *Botrytis cinerea*. *Journal of Plant Protection*, 47(5): 1167–1168 (in Chinese) [陈利军, 智亚楠, 王春生, 陈金珠, 金银利, 陈月华. 2020. 土荆芥挥发油对灰葡萄孢熏蒸抑制的机理分析. *植物保护学报*, 47(5): 1167–1168]
- Cui KD, Huang XP, He LM, Zhai YB, Mu W, Liu F. 2017. The inhibition effect of microbial volatile compound benzothiazole on *Botrytis cinerea*. *Scientia Agricultura Sinica*, 50(19): 3714–3722 (in Chinese) [崔凯娣, 黄学屏, 何磊鸣, 翟永彪, 慕卫, 刘峰. 2017. 微生物源挥发性化合物苯并噻唑对灰霉病菌的抑制效应. *中国农业科学*, 50(19): 3714–3722]
- Dean R, van KAN JAL, Pretorius ZA, Hammond-Kosack KE, di PIETRO A, Spanu PD, Rudd JJ, Dickman M, Kahmann R, Ellis J, et al. 2012. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(4): 414–430
- Dong WX, Li BQ, Li SZ, Lu XY, Ma P, Guo QG. 2013. The fengycin lipopeptides are major components in the *Bacillus subtilis* strain NCD-2 against the growth of *Botrytis cinerea*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 43(4): 401–410 (in Chinese) [董伟欣, 李宝庆, 李社增, 鹿秀云, 马平, 郭庆港. 2013. 脂肽类抗生素 fengycin 在枯草芽孢杆菌 NCD-2 菌株抑制番茄灰霉病菌中的功能分析. *植物病理学报*, 43(4): 401–410]
- Fernando WGD, Ramarathnam R, Krishnamoorthy AS, Savchuk SC. 2005. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(5): 955–964
- Gao HY, Li PZ, Xu XX, Zeng Q, Guan WQ. 2018. Research on volatile organic compounds from *Bacillus subtilis* CF-3: biocontrol effects on fruit fungal pathogens and dynamic changes during fermentation. *Frontiers in Microbiology*, 9: 456
- Ginsberg G, Toal B, Kurland T. 2011. Benzothiazole toxicity assessment in support of synthetic turf field human health risk assessment. *Journal of Toxicology and Environmental Health: Part A*, 74(17): 1175–1183
- Han J, Fan HF, Wang HN, Liu F. 2011. Development progress of fungicides against *Botrytis cinerea*. *Agrochemicals Research & Application*, (3): 5–10 (in Chinese) [韩君, 范怀峰, 王海娜, 刘峰. 2011. 防治灰霉病药剂的开发进展. *农药研究与应用*, (3): 5–10]
- Kai M, Hausteine M, Molina F, Petri A, Scholz B, Piechulla B. 2009. Bacterial volatiles and their action potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(6): 1001–1012
- Kishimoto K, Matsui K, Ozawa R, Takabayashi J. 2007. Volatile 1-octen-3-ol induces a defensive response in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of General Plant Pathology*, 73(1): 35–37
- Li GQ, Wang DB, Zhou Q, Huang HZ. 1997. Study on diversity of *Sclerotinia sclerotiorum* in sclerotial germinations. *Journal of Plant Protection*, 24(1): 59–64 (in Chinese) [李国庆, 王道本, 周启, 黄鸿章. 1997. 核盘菌菌核萌发多样性的研究. *植物保护学报*, 24(1): 59–64]
- Li QS, Xie ZM, Liu Z, Zhang GL, Wu DM, Tian Y. 2018. Screening and identification of antagonistic bacterium H14 against *Verticillium dahliae* Kleb. and its antagonistic mechanisms. *Journal of Plant Protection*, 45(6): 1204–1211 (in Chinese) [李全胜, 谢宗铭, 刘政, 张国丽, 武冬梅, 田英. 2018. 棉花黄萎病拮抗细菌 H14 的筛选鉴定及其拮抗机理分析. *植物保护学报*, 45(6): 1204–1211]
- Liu WW, Zhao LJ, Wang C, Mu W, Liu F. 2009. Bioactive evaluation and application of antifungal volatiles generated by five soil bac-

- teria. Journal of Plant Protection, 36(2): 97-105
- Mercier J, Smilanick JL. 2005. Control of green mold and sour rot of stored lemon by biofumigation with *Muscador albus*. Biological Control, 32(3): 401-407
- Miao JQ, Wang M, Li XH, Yang FH, Liu F. 2012. Antifungal and nematocidal activities of five volatile compounds against soil-borne pathogenic fungi and nematodes. Journal of Plant Protection, 39(6): 561-566 (in Chinese) [苗建强, 王猛, 李秀环, 杨法辉, 刘峰. 2012. 五种挥发性化合物对土传病原真菌及线虫的生物活性. 植物保护学报, 39(6): 561-566]
- Minuto A, de Spadaro D, Garibaldi A, Gullino ML. 2006. Control of soilborne pathogens of tomato using a commercial formulation of *Streptomyces griseoviridis* and solarization. Crop Protection, 25(5): 468-475
- Rajer FU, Wu HJ, Xie YL, Xie SS, Raza W, Tahir HAS, Gao XW. 2017. Volatile organic compounds produced by a soil-isolate, *Bacillus subtilis* FA26 induce adverse ultra-structural changes to the cells of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, the causal agent of bacterial ring rot of potato. Microbiology, 163(4): 523-530
- Sumayo M, Hahm MS, Ghim SY. 2013. Determinants of plant growth-promoting *Ochrobactrum lupini* KUDC1013 involved in induction of systemic resistance against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* in tobacco leaves. Plant Pathology Journal, 29(2): 174-181
- Tahir HAS, Gu Q, Wu HJ, Niu YD, Huo R, Gao XW. 2017. *Bacillus* volatiles adversely affect the physiology and ultra-structure of *Ralstonia solanacearum* and induce systemic resistance in tobacco against bacterial wilt. Scientific Reports, 7: 40481
- Wan MG, Li GQ, Zhang JB, Jiang DH, Huang HC. 2008. Effect of volatile substances of *Streptomyces platensis* F-1 on control of plant fungal diseases. Biological Control, 46(3): 552-559
- Wang J, Zhang JR, Cui CM, Chen X, Chang ZY, Li XS, Chi X, Wei SY. 2006. Advances in the study of sclerotia of sunflower. Inner Mongolia Agricultural Science and Technology, (6): 25-28 (in Chinese) [王静, 张剑茹, 崔超敏, 陈霞, 常智勇, 李笑硕, 池玺, 卫树银. 2006. 向日葵菌核病研究进展. 内蒙古农业科技, (6): 25-28]
- Wang Q. 2014. Cloning of the bacteriostat related gene and identification of antifungal substances from *Bacillus subtilis* S-16. Master thesis. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University (in Chinese) [王祺. 2014. 枯草芽孢杆菌 S-16 抑制核盘菌形成活性物质的鉴定及其相关功能基因的克隆. 硕士学位论文. 呼和浩特: 内蒙古农业大学]
- Xie SS, Zang HY, Wu HJ, Rajer FU, Gao XW. 2018. Antibacterial effects of volatiles produced by *Bacillus* strain D13 against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Molecular Plant Pathology, 19(1): 49-58
- Yi B. 2006. A novel fungicide: diazimide. World Pesticides, 28(5): 51-53 (in Chinese) [亦冰. 2006. 新颖杀菌剂: 啉酰菌胺. 世界农药, 28(5): 51-53]
- Yu ZX, He MY, Wang RK, Han L, Zhou L. 2018. Advances in the application of antagonistic yeasts to manage postharvest diseases in fruit. Journal of Fruit Science, 35(3): 358-366 (in Chinese) [喻最新, 贺明阳, 王日葵, 韩冷, 周炼. 2018. 利用拮抗酵母防治水果采后病害的研究进展. 果树学报, 35(3): 358-366]
- Zhang YM. 2010. Isolation, identification and primary study of an antagonistic bacterium strain S-16 of *Sclerotinia sclerotiorum* of sunflower. Master thesis. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University (in Chinese) [张一名. 2010. 向日葵菌核病生防菌的分离鉴定以及抗菌机制的初步研究. 硕士学位论文. 呼和浩特: 内蒙古农业大学]
- Zheng XX, Zhang N, Yan RX, Chen CK, Guan WQ. 2019. Control effects of different *Bacillus* strains against postharvest *Alternaria alternata* of super-early maturing peach and analysis of volatile organic compounds of its fermented broth. Science and Technology of Food Industry, 40(14): 144-150, 156 (in Chinese) [郑香香, 张娜, 阎瑞香, 陈存坤, 关文强. 2019. 不同芽孢杆菌对极早熟桃采后链格孢菌的防治效果及其发酵液挥发性物质成分分析. 食品工业科技, 40(14): 144-150, 156]
- Zhao Y, Miao ZY, Li Y, Bai YJ. 2014. Research progress on controlling against tomato gray mold. China Plant Protection, 34(7): 21-29 (in Chinese) [赵杨, 苗则彦, 李颖, 白元俊. 2014. 番茄灰霉病防治研究进展. 中国植保导刊, 34(7): 21-29]
- Zhou C, Qiao LQ, Jin J, Ma Y, Zhao XT, Liu HX. 2011. Preliminary study on the inhibitory effect of the volatile substances produced by *Bacillus subtilis*. Chinese Journal of Pesticide Science, 13(2): 201-204 (in Chinese) [周翠, 乔鲁芹, 金静, 马跃, 赵相涛, 刘会香. 2011. 一株枯草芽孢杆菌挥发性物质的抑菌作用初步研究. 农药学报, 13(2): 201-204]

(责任编辑:李美娟)