

DOI:10.13718/j.cnki.zwys.2021.02.008

## 纳米氧化锌对烟草疫霉菌的抑菌作用研究<sup>①</sup>

陈娟妮, 鲁梅, 丁伟

西南大学 植物保护学院, 重庆 400715

**摘要:**烟草黑胫病是由烟草疫霉菌(*Phytophthora nicotianae*)引起的一种毁灭性真菌病害, 发病率高, 分布范围广, 严重威胁烟草业的可持续发展。目前, 抗病育种和化学防治是防治该病害的主要措施, 但这些方法存在很多弊端。因此, 寻求新策略高效防治黑胫病已经迫在眉睫。本研究在室内条件下研究纳米氧化锌(ZnO NPs)对烟草疫霉菌的抗真菌活性。结果发现, ZnO NPs显著抑制烟草疫霉菌菌丝生长, 降低孢子囊产生, 降低游动孢子萌发率, 且呈现浓度依赖性, 尤其是当处理浓度达到800 mg/L时, 菌丝几乎不再生, 游动孢子完全不萌发。通过透射和扫描电镜观察发现, ZnO NPs破坏疫霉菌菌丝结构, 导致菌丝干瘪、形态畸形、细胞质空化。本研究为发展ZnO NPs做为潜在农业抗真菌剂提供了理论基础。

**关键词:** 纳米氧化锌; 烟草疫霉菌; 菌丝; 菌丝形态; 游动孢子

**中图分类号:** S435.72   **文献标志码:** A   **文章编号:** 1007-1067(2021)02-0034-07

烟草黑胫病是由烟草疫霉菌(*Phytophthora nicotianae*)引起的一种典型的土传真菌性病害<sup>[1]</sup>。病原菌一般通过植株伤口侵入或直接侵入, 通常以茎基部为主, 逐渐通过菌落形成蔓延至整个维管系统, 最终导致植株萎蔫, 直至死亡<sup>[2]</sup>。该病菌以菌丝体和衣原体孢子越冬于土壤或混合堆肥的植物残体组织中, 也能在土壤中腐生, 可达2年以上。近几年, 重庆等西南烟区因长期连作障碍, 引起作物代谢紊乱、生长受阻和病害加重, 导致该病害发生范围广、防治难度大。据调查, 烟草田黑胫病在连作土壤的发病率为18%以上。

目前农业上以选育抗性品种和化学防治2种防治措施为主。但是, 过度不合理的大量使用杀菌剂(主要以甲霜灵、敌克松、代森锰锌等药剂为主), 一方面给生态环境和人类健康造成极大的负面影响, 另一方面诱导烟草疫霉菌抗药性增强<sup>[3]</sup>。而病原菌致病性的变异和新毒性群体的出现, 往往使经过数年培育的抗病品种在推广种植几年后就丧失了抗病性, 传统化学杀菌剂药效很大程度减弱, 施用浓度反过来也愈来愈大, 这种连锁效应越来越严重, 使得病害愈发难防治<sup>[4]</sup>。因此, 要想更安全高效破解这一病害难题, 现有技术体系有限, 靠利用大生态因子也不行, 而是必须借助现代新型技术寻求针对烟草黑胫病的新策略, 这个需求已迫在眉睫。

近几年, 纳米技术作为一种新兴跨学科的研究领域, 在植物保护和营养平衡方面具有广泛的应用前景, 如农药输送、纳米传感器、农药降解、高效利用微量元素等<sup>[5-7]</sup>。纳米粒子(Nanoparticle, NPs)是指在三维空间中至少有一维处于纳米尺寸(1~100 nm)或由它们作为基本单元构成的材料, 具备优越的物理化学性质、高比表面积和独特的纳米结构等特点。一些无机和有机金属氧化物纳米颗粒越来越多地被用做生物医学上抗菌药物替代剂、包装材料和植物病害杀菌剂等<sup>[8]</sup>。最近的研究结果表明, 一些金属和金属氧

① 收稿日期: 2021-02-27

基金项目: 国家自然科学基金(32001934); 中央高校基本业务费一般项目(XDJK2019C076)。

作者简介: 陈娟妮, 讲师, 主要从事纳米材料的生物学效应研究。E-mail: chenhuanni521@126.com

通信作者: 丁伟, 教授, 主要从事天然产物农药和植物微生态过程与调控研究。E-mail: 577008194@qq.com

化物纳米粒子,包括二氧化钛( $\text{TiO}_2$ )、氧化锌( $\text{ZnO}$ )、银( $\text{Ag}$ )、氧化镁( $\text{MgO}$ )、氧化铜( $\text{CuO}$ ),无机纳米材料,包括二氧化硅( $\text{SiO}_2$ )、碳纳米管(SWCNTs)、氧化石墨烯(GO)等,不仅在体外条件可以抑制病原菌的生长,而且在温室和田间试验条件下对作物病害也表现出良好的防控效果<sup>[9-15]</sup>.有些纳米材料尽管对植物病原菌无直接的抑菌作用,但是可以激活植物的防御系统,提高植物的抗病性,从而促进植物生长<sup>[16]</sup>.

其中,氧化锌纳米颗粒( $\text{ZnO}$  NPs)具备纳米材料小尺寸、高比表面积等优良性能.另外,由于其表面原子缺乏相邻的配位原子,在颗粒表面留下许多悬空键,表面原子的价态发生改变,产生许多活性位点,增加反应几率, $\text{ZnO}$  NPs表现出很强的化学活性和选择性,具有抗红外、紫外和杀菌的功能.因此, $\text{ZnO}$  NPs是一种新型的多功能抗菌药物,在很多领域有着独特的优势,尤其在植物病害防控方面<sup>[17]</sup>.值得注意的是,表面原子邻位的空缺导致能量较高,增强纳米氧化锌与细菌的亲合力,提高抗菌效率<sup>[18]</sup>.但是 $\text{ZnO}$  NPs对植物病原真菌的作用机制还不明确.因此,本文以烟草黑胫病的病原菌(烟草疫霉菌)作为研究对象,在室内系统性测定了 $\text{ZnO}$  NPs的抗真菌作用,并初步探讨了其作用机制,以期为发展新型纳米抗菌剂提供科学依据.

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 供试菌种

烟草疫霉菌(*Phytophthora nicotianae*),由采集自重庆彭水烟区的烟草黑胫病样品中分离而来.

### 1.2 供试试剂

$\text{ZnO}$  NPs 购买自美国西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司(Sigma-AldrichLLC.)

燕麦培养基,称取燕麦片 30 g,加入 1 000 mL,倒入锅中煮沸约 15 min,再用 3~4 层纱布过滤,倒入烧杯中定容至 1 000 mL,之后加入 7.5 g 左右琼脂粉,重新置于锅中煮至琼脂粉融化,分装到锥形瓶中,121 °C 高压灭菌 1 h 后即可.

烟草疫霉菌诱导产孢溶液(MSS 溶液),其配方为: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.004 mol/L,  $\text{KNO}_3$  0.05 mol/L, Fe-EDTA 1 mL,蒸馏水 1 000 mL;其中 Fe-EDTA 的配方为 EDTA- $\text{Na}_2$  14.86 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  24.9 g,蒸馏水 1 000 mL.

### 1.3 供试仪器

超净工作台(AIRTECH),苏净安泰公司生产;立式自动电热压力蒸汽灭菌器(LDZX-40BI),上海申安医疗器械厂生产;电热恒温培养箱(DHP-9272),上海齐欣科学仪器有限公司生产;电子精密天平,梅特勒-托利多仪器上海有限公司生产;光学显微镜 XC23,奥林巴斯(中国)有限公司生产.

### 1.4 $\text{ZnO}$ NPs 对疫霉菌菌丝生长的抑制试验

称取一定量的  $\text{ZnO}$  NPs 分别加入燕麦培养基中,配制成 25, 50, 100, 200, 400 和 800 mg/L 不同质量浓度,震荡均匀后放入灭菌锅中,121 °C 灭菌 20 min. 灭菌完成后,将 15 mL 的带药培养基倒入培养皿中制成固体培养基.将不添加任何材料的培养基作为空白对照.随后,采用灭菌的打孔器(孔径 5 mm)在培养 3 d 的烟草疫霉菌菌落边缘打孔,用挑种针挑取一个菌块放入每个培养皿中央,每个处理重复 3 次.所有接菌的培养皿倒置放入 26 °C 恒温培养箱黑暗条件下培养 3 d,然后用采用十字交叉法测量每皿的菌落直径<sup>[12]</sup>.

### 1.5 菌丝形态结构观察

#### 1.5.1 透射电镜观察

挑取在培养基上培养 3 d 的烟草疫霉菌边缘菌丝于无菌离心管中,随后将疫霉菌丝和  $\text{ZnO}$  NPs (400 mg/L)在 30 °C 条件下黑暗孵育 3 h,菌丝与无菌水孵育作为对照.紧接着,所有处理样品在 6 000 rpm 下离心,所得菌丝用 2.5%戊二醛固定后,再用 1%水溶性  $\text{OsO}_4$  固定,随后用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 值=7.0)冲洗之后,样品在一系列梯度乙醇(30%, 50%, 70%, 80%, 90%和 100%)里分别脱水 15 min,

并且在真空干燥箱中烘干。最后,一小薄层菌丝置于铜网上在 TecnaiG20 透射电镜(FEI, Czech)上进行观察。

### 1.5.2 扫描电镜观察

将上述处理的烟草疫霉菌菌丝的形态变化进一步通过扫描电镜观察。待离心收集菌丝后,菌丝用丙二醛固定 2 h,再用 30%,50%,70%,90%和 100%的乙醇分别脱水 15 min,随后用锇酸熏 3 h 后,置于铜网喷金,随后直接在扫描电镜下观察。

## 1.6 ZnO NPs 对烟草疫霉菌孢子囊产生的抑制作用

在超净工作台上,在培养 2 周的烟草疫霉菌平板上打出直径为 1 cm 的菌苔圆片备用。分别在含不同浓度 ZnO NPs 的产孢培养液中浸入 6 个菌苔圆片,将接种的培养皿用封口膜密封好后,置于恒温培养箱中 26 °C,光照培养 24 h 后取出,在 BH200 双目光学显微镜下观察各浓度处理后的烟草疫霉菌孢子囊产生数量,并采集光学照片<sup>[17]</sup>。

## 1.7 ZnO NPs 对烟草疫霉菌游动孢子萌发的抑制作用

### 1.7.1 孢子悬浮液的制备

同样地,在超净工作台中,将菌苔圆片放入产孢培养液中,光照培养 24 h 后,然后用移液枪将产孢培养液完全吸取后弃掉,重新密封培养。随后,将菌块置于 4 °C 冰箱中处理 10~15 min,再室温放置 30 min,促使孢子囊破碎。然后,每皿中加入 1 mL 超纯水,并用移液枪均匀地吹打菌苔圆片的表面,多次吹打后,吸取溶液置于无菌离心管中,离心管中即为含大量释放的游动孢子以及少量菌丝和孢子囊的悬浮液。将上述悬浮液的离心管置于涡旋振荡器上,涡旋振荡 2~3 min,使游动孢子的鞭毛尽可能去除,即得孢子悬浮液。

### 1.7.2 孢子萌发抑制试验

取 0.5 mL 不同质量浓度(0, 100, 200, 400, 800 mg/L)的 ZnO NPs 分散液加入试管中,然后分别加入 0.5 mL 制备好的孢子悬浮液,使药液与孢子悬浮液等量混合,再用移液枪吸取 30  $\mu$ L 的上述混合液滴加到凹玻片的凹槽中,将凹玻片放置在铺有纱布(已浸湿)的磁盘中,密封保湿,置于 26 °C 培养箱黑暗培养。每个处理重复 4 次。当空白对照孢子萌发率达到 80%以上时,在光学显微镜下观察不同处理孢子的萌发情况,并统计孢子萌发率。

## 1.8 数据分析

试验数据采用 SPSS 17.0 软件进行差异显著性分析,以 Duncan 氏新复极差法(DMRT)进行差异显著性检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 ZnO NPs 对烟草疫霉菌菌丝生长的抑制作用

结果显示,在相同的培养条件下,分别用不同质量浓度 ZnO NPs(25, 50, 100, 200, 400 和 800 mg/L)处理烟草疫霉菌,待其生长 3 d 后,ZnO NPs 显著性抑制烟草疫霉菌菌丝生长,且随着处理质量浓度的增大,抗菌作用也越来越强,表明该纳米粒子材料的抗真菌性呈现浓度依赖性。从图 1 可以看出,对照处理(ZnO NPs 0 mg/L)的菌落浓密,菌丝萌发速度快、长势较好,菌落直径达到 7.3 cm,而不同浓度 ZnO NPs 处理后的菌落直径依次为 6.44 cm, 4.87 cm, 3.32 cm, 2.76 cm, 2.11 cm, 1.50 cm,抑制率分别为 13.20%, 34.37%, 55.26%, 62.80%, 71.56%, 79.78%。从培养皿照片可以直观看出,从 50 mg/L 处理质量浓度开始,菌落生长缓慢,当处理质量浓度达到 800 mg/L,菌丝几乎不生长(图 1)。

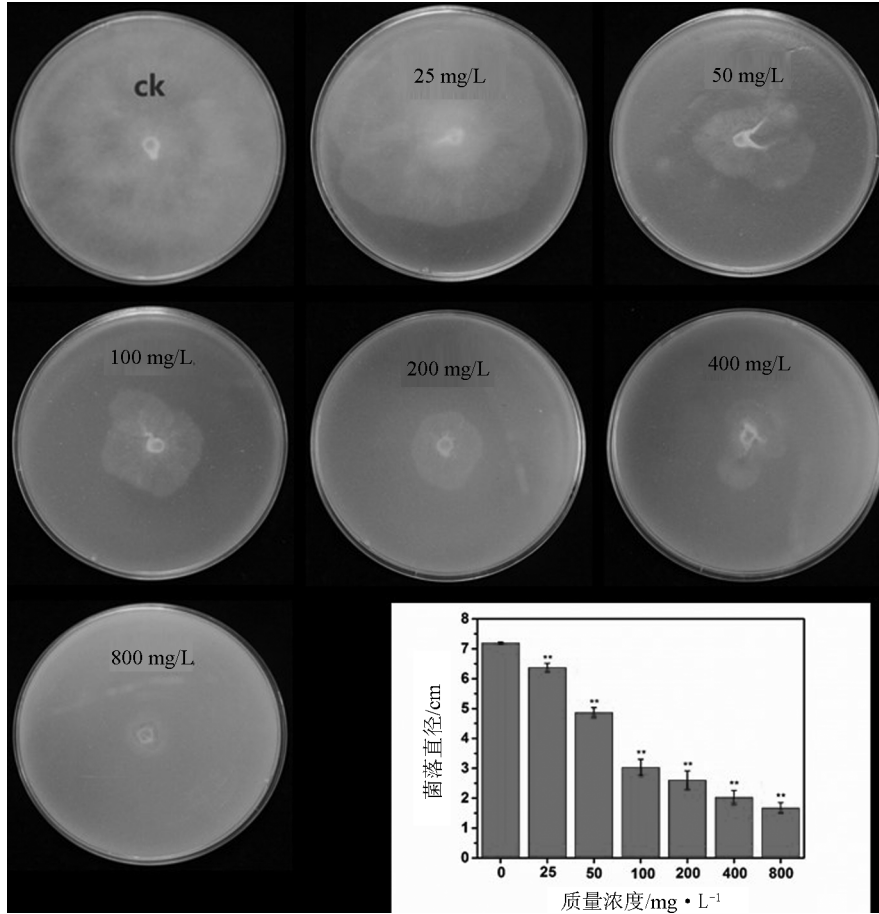


图 1 不同质量浓度的 ZnO NPs 对烟草疫霉菌菌丝生长的抑制作用

### 2.2 ZnO NPs 对烟草疫霉菌菌丝形态结构的影响

从图 2 的透射电镜图可以看出, 未经药剂处理(CK)的菌丝细胞, 细胞内细胞器结构完整, 胞外无外渗物, 线粒体均匀, 细胞核结构完整. 而 ZnO NPs 处理后的烟草疫霉菌菌丝细胞质结构紊乱, 有较大的空腔形成, 含有大量的无透明的内含物; 菌丝细胞外有染色比较深的物质, 可能是细胞膜结构遭到破坏后, 导致细胞壁外围沉积了大量的不明外渗物所致. 菌丝结构进一步通过扫描电镜观察, 可以看出, 对照组的菌丝饱满、表面光滑, 菌丝隔膜间距较长; 经 ZnO NPs 处理后, 菌丝干瘪变形, 菌丝隔膜间距变短(图 3).

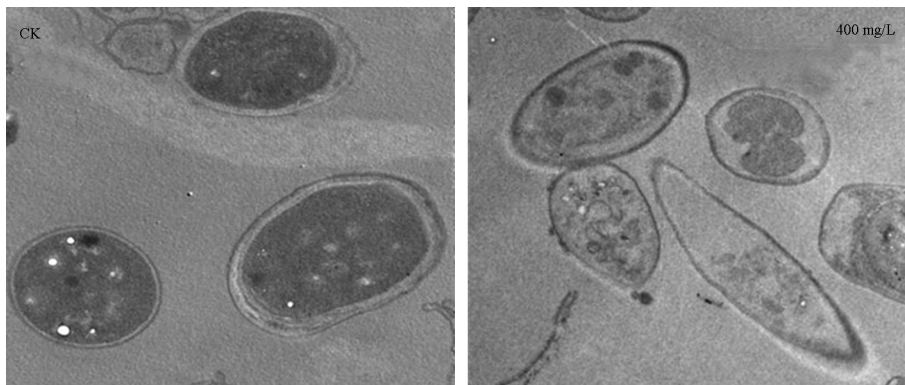


图 2 透射电镜观察 ZnO NPs 处理后烟草疫霉菌的菌丝形态结构

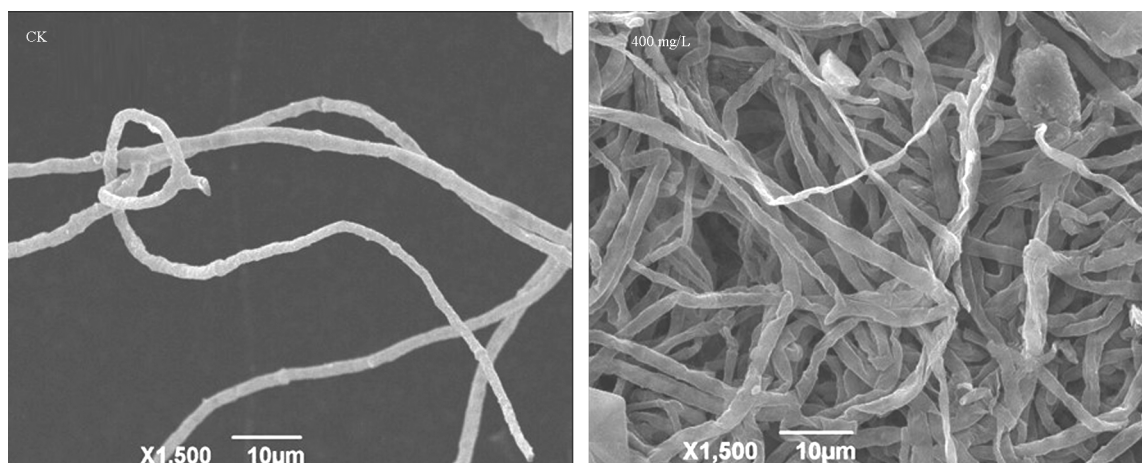


图 3 扫描电镜观察 ZnO NPs 处理后烟草疫霉菌的菌丝形态结构

### 2.3 ZnO NPs 对烟草疫霉菌孢子囊产生的影响

通过前期试验发现低质量浓度(25, 50, 100 mg/L)ZnO NPs 对疫霉菌孢子囊的产生没有显著性抑制作用. 但是, 从图 4 可以看出, 未经任何处理的烟草疫霉菌菌丝产生了大量的孢子囊(白色箭头处), 而用高质量浓度(200, 400, 800 mg/L)ZnO NPs 处理烟草疫霉菌后, 仅在 200 mg/L 下只有极少数的孢子囊产生. 随着 ZnO NPs 浓度的升高, 菌丝体几乎不再产生孢子囊, 视野中的黑点是 ZnO NPs 的沉积物.

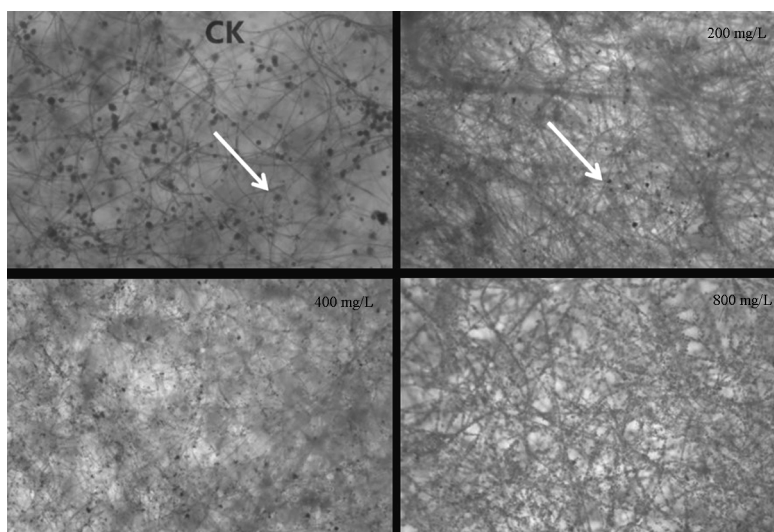


图 4 不同浓度 ZnO NPs 处理后烟草疫霉菌孢子囊照片

### 2.4 ZnO NPs 对烟草疫霉菌游动孢子萌发的影响

经过 4 h 的黑暗培养, 待对照组孢子萌发率达到 80% 以上时, 即可采用光学显微镜观察各浓度处理后游动孢子的萌发情况. 由图 5 可以看出, 对照游动孢子两端均长出芽管(箭头处), 萌发率达到 95%, 而当 200, 400, 800 mg/L ZnO NPs 处理后烟草疫霉菌的游动孢子萌发率显著地被抑制, 尤其是在 800 mg/L 处理下, 游动孢子完全没有萌发, 但有孢子囊的存在.

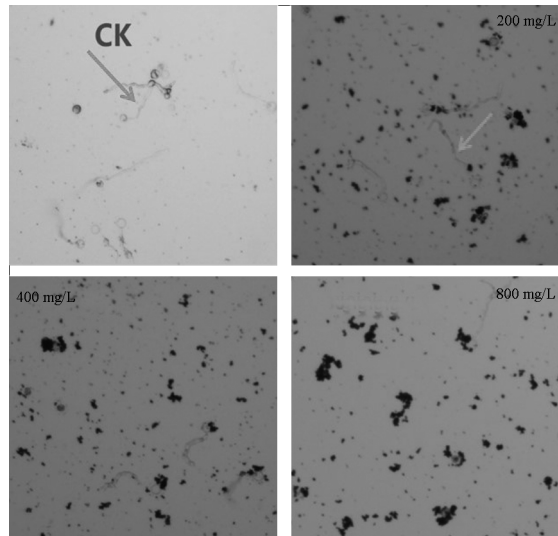


图 5 不同浓度 ZnO NPs 对烟草疫霉菌游动孢子萌发的抑制作用

### 3 结论与讨论

大量室内和田间试验研究已经证明纳米材料对植物病害具有明显的防控效果,且有些金属纳米颗粒已经在农业领域得到了广泛应用,这已然成为国内外学者的研究热点.目前有 3 种常用的纳米农药用于防治农作物病害.一种是纳米嵌入农药,是指农药和纳米材料溶解并包裹在颗粒中,或者吸附并附着在颗粒的表面<sup>[19]</sup>;二是原农药纳米加工技术使农药纳米化,如微乳剂农药液体和固体农药直接制备纳米粒子,可以提高农药在水中的分散和稳定,提高农药的比表面积,减少添加剂和有机溶剂的数量,减少农药的表面张力,促进目标的吸收,提高农药利用率<sup>[20]</sup>;三是纳米材料直接被用作杀菌剂和杀虫剂,如纳米银、纳米铜、纳米二氧化钛、纳米氧化铜等,这也是目前最热门的研究方向<sup>[5]</sup>.但是,有关 ZnO NPs 对植物病原真菌的研究尚处于边缘状态,抗菌机制研究也不够深入.因此,本文主要从 4 个方面探索 ZnO NPs 对烟草疫霉菌的作用机制.

本文试验结果发现,ZnO NPs 对烟草疫霉菌的菌丝生长表现出显著的抑制效果,且当其浓度接近 800 mg/L 时,菌丝几乎不生长,且菌丝体只有少数孢子囊的产生.这可能是由于 ZnO NPs 与疫霉菌菌丝直接接触后,菌丝结构受到破坏,变得畸形干瘪.另一方面,随着 ZnO NPs 质量浓度的增大,游动孢子萌发率降低,当质量浓度达到 800 mg/L 时,游动孢子几乎不萌发.烟草疫霉菌主要靠菌丝体和病菌孢子囊来致病侵染的,通过菌丝体的生长扩散和孢子囊的萌发导致疫霉菌滋生,通过伤口侵染烟草茎基部,进而危害到烟草的健康生长,使其质量和产量受损,造成不可预估的经济损失.因此,本研究已经证实 ZnO NPs 对烟草疫霉菌菌丝生长、孢子囊产生和孢子萌发具有显著的抑制作用,表明 ZnO NPs 在防控烟草黑胫病方面具有很大的应用前景,为该病害的科学防控提供参考依据.但是,本研究主要着重于室内抗菌性测定,还需进一步进行大量的田间试验来验证 ZnO NPs 是否可以有效防控烟草黑胫病.

#### 参考文献:

- [1] 马国胜,高智谋,陈娟.烟草黑胫病菌研究进展(I)[J].烟草科技,2003,36(4):35-42.
- [2] 谢联辉.普通植物病理学[M].北京:科学出版社,2006.
- [3] 毛倪寿.烟草黑胫病田间发生规律及综合防治技术的研究[D].西安:西安交通大学,2002.
- [4] IMFELD G, VUILLEUMIER S. Measuring the Effects of Pesticides on Bacterial Communities in Soil: A Critical Review. *European Journal of Soil Biology*, 2012, 49: 22-30.
- [5] GHORMADE V, DESHPANDE M V, PAKNIKAR K M. Perspectives for Nano-Biotechnology Enabled Protection and Nutrition of Plants [J]. *Biotechnology Advances*, 2011, 29(6): 792-803.
- [6] PETER RUUD JB, BOUWMEESTER H, GOTTARDO S, et al. Nanomaterials for Products and Application in Agricul-

- ture, Feed and Food. Trends in Food Science & Technology, 2016, 54, 155-164.
- [7] 孙长娇, 崔海信, 王 琰, 等. 纳米材料与技术 在农业上的应用研究进展 [J]. 中国农业科技导报, 2016, 18(1): 18-25.
- [8] KALHAPURE R S, SULEMAN N, MOCKTAR C, et al. Nanoengineered Drug Delivery Systems for Enhancing Antibiotic Therapy[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2015, 104(3): 872-905.
- [9] CHEN J N, SUN L, CHENG Y, et al. Graphene Oxide-Silver Nanocomposite: Novel Agricultural Antifungal Agent Against *Fusarium graminearum* for Crop Disease Prevention [J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2016, 8(36): 24057-24070.
- [10] PARET M L, VALLAD G E, AVERETT D R, et al. Photocalysis: Effect of Light-activated Nanoscale Formulations of TiO<sub>2</sub> *Xanthomonas perforans* and Control of Bacterial Spot of Tomato[J]. Phytopathology, 2013, 103(3): 228-236.
- [11] GIANNOUSI K, AVRAMIDIS I, DENDRINOU-SAMARA C. Synthesis, Characterization and Evaluation of Copper Based Nanoparticles as Agrochemicals Against *Phytophthora infestans* [J]. RSC Advances, 2013, 3(44): 21743.
- [12] CHEN J, PENG H, WANG X, et al. Graphene Oxide Exhibits Broad-Spectrum Antimicrobial Activity Against Bacterial Phytopathogens and Fungal Conidia by Intertwining and Membrane Perturbation [J]. Nanoscale, 2014, 6(3): 1879-1889.
- [13] 宋 娜. 纳米光半导体材料二氧化钛的制备及对黄瓜霜霉病的防治效果[D]. 吉林: 吉林农业大学, 2005.
- [14] 陈娟妮, 蔡 璘, 李石力, 等. 纳米技术在植物病害防控中应用的研究进展 [J]. 植物保护学报, 2019, 46(1): 142-150.
- [15] CHEN J, WU L, LU M, et al. Comparative Study on the Fungicidal Activity of Metallic MgO Nanoparticles and Macroscale MgO Against Soilborne Fungal Phytopathogens [J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 365.
- [16] 王荔军, 王运华, 周益林, 等. 纳米结构 SiO<sub>2</sub> 与植物真菌病害发生的关系 [J]. 华中农业大学学报, 2001, 20(6): 593-597.
- [17] 王虎军, 路 军, 薛华丽, 等. 纳米氧化锌对甜瓜主要致病菌抑菌活性研究 [J]. 食品工业科技, 2016, 37(4): 356-359, 364.
- [18] ARUOJA V, DUBOURGUIERHC, KASEMETS K, et al. Toxicity of Nanoparticles of CuO, ZnO and TiO<sub>2</sub> to Microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. Science of The Total Environment. 2009; 407(4): 1461-1468.
- [19] NURUZZAMAN M, RAHMAN M M, LIU Y J, et al. Nanoencapsulation, Nano-Guard for Pesticides; a New Window for Safe Application [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(7): 1447-1483.
- [20] KAH M, BEULKE S, TIEDE K, et al. Nanopesticides: State of Knowledge, Environmental Fate, and Exposure Modeling [J]. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 2013, 43(16): 1823-1867.

## Study on the Antifungal Effect of Zinc Oxide Nanoparticles on *Phytophthora nicotianae*

CHEN Juan-ni, LU Mei, DING Wei

School of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400715, China

**Abstract:** Tobacco black shank disease, caused by *Phytophthora nicotianae*, is a devastating disease, which puts a serious threat to the sustainable development of the tobacco industry. At present, the main control measures of tobacco black shank disease are still application of chemical agents and cultivation of resistant varieties. However, these control technologies have many disadvantages. Therefore, it is urgent to seek new strategies to effectively prevent black shank disease. In order to provide a theoretical basis for the development of potential agricultural antifungal agents, the antifungal activity of zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) against *P. nicotianae* in vitro was investigated in laboratory. The results showed that ZnO NPs significantly inhibited mycelial growth of *Ph. nicotianae*, decreased its sporangium production, and reduced its zoospore germination rate, all of which appeared to be concentration-dependent. Especially, when the concentration of ZnO NPs reached 800 mg/L, the mycelia barely stopped growing and the zoospore hardly germinated. Transmission electron microscopy (TEM) and scanning electron microscopy (SEM) examinations revealed that ZnO NPs destroyed the mycelial structure of *P. nicotianae*, resulting in mycelial shrinkage, morphological deformities and cytoplasmic cavitation.

**Key words:** ZnO nanoparticle; *Phytophthora nicotianae*; hypha; hypha morphology; zoospore