

· 研究论文 ·

氰烯菌酯对禾谷镰孢菌分生孢子萌发及菌丝生长的影响

陈雨, 张文芝, 周明国*

(南京农业大学 农业部病虫监测与治理重点开放实验室, 南京 210095)

摘要: 氰烯菌酯 (2-氰基-3-氨基-3-苯基丙烯酸乙酯, JS399-19) 是一种对禾谷镰孢菌 *Fusarium graminearum* 具有专化活性的新型杀菌剂。离体条件下, 采用菌丝生长速率法测定了该药剂对禾谷镰孢菌抗性菌株和敏感菌株的生长抑制活性; 同时采用孢子萌发法测定了其对于禾谷镰孢菌分生孢子萌发的影响。结果表明, 氰烯菌酯能够强烈地抑制禾谷镰孢菌敏感菌株菌丝的生长, EC_{50} 值分布在 0.092~0.141 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间; 并可降低敏感菌株分生孢子的萌发速率, 以及影响其萌发的方式, 使芽管从分生孢子基部和中间细胞萌发的比率增加; 同时氰烯菌酯使敏感菌株分生孢子膨大、畸形, 并使其芽管肿胀、扭曲, 明显抑制其芽管的伸长生长; 但对抗性菌株的抑制作用和致畸作用不明显。

关键词: 氰烯菌酯; 小麦赤霉病; 禾谷镰孢菌; 孢子萌发; 致畸作用

中图分类号: S482.2 文献标识码: A 文章编号: 1008-7303(2007)03-0235-05

Effects of JS399-19 on Conidial Germination and Mycelial Growth of *Fusarium graminearum*

CHEN Yu, ZHANG Wen-zhi, ZHOU Ming-guo*

(Key Laboratory of Monitoring and Management of Plant Diseases and Insects, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract JS399-19 (2-cyano-3-amino-3-phenylacrylic acetate) is a novel fungicide exhibiting specific activity against *Fusarium graminearum*. In vitro, the inhibitory activity of the fungicide against mycelial growth of both sensitive and resistant isolates of *Fusarium graminearum* was measured and the influence of the fungicide on conidial germination of *Fusarium graminearum* was determined. The results showed that JS399-19 could strongly inhibit the mycelial growth of a sensitive isolate of *Fusarium graminearum* with the EC_{50} values 0.092~0.141 $\mu\text{g}/\text{mL}$. JS399-19 decreased the speed of conidial germination of the sensitive isolate of *Fusarium graminearum*, strongly inhibited the germ tube growth of the conidia and affected the conidia germination by increasing the ratio of the tubes germinated from the basal and that from the middle parts of the conidia increased. Moreover, JS399-19 could cause abnormality of conidia and the tubes of the sensitive isolate, by inducing the conidia and the tubes swollen and contorted, respectively. However, the fungicide weakly affected the JS399-19-resistant isolates.

收稿日期: 2007-05-06 修回日期: 2007-08-22

作者简介: 陈雨 (1982-), 男, 安徽铜陵人, 博士研究生, 从事杀菌剂方面研究; * 通讯作者 (Author for correspondence): 周明国 (1958-), 男, 江苏南通人, 教授, 博士生导师, 主要从事植物病害化学防治研究。联系电话: 025-84395641; E-mail: m_gzhou@njau.edu.cn

基金项目: 国家“973”计划 (2006CB101900); 国家科技支撑计划 (2006BAE01A04-08); 国家“863”计划 (2006AA10A211); 国家自然科学基金 (30671048, 30671384); 高等学校博士学科点专项科研基金 (20050307028); 江苏省科技攻关项目 (BG2006328)

Key words JS199-19 wheat scab *Fusarium graminearum*; conidial germination abnormal activity

禾谷镰孢菌 *Fusarium graminearum* Schw. 有性态为玉黍蜀赤霉 *Gibberella zeae* Petch 是许多植物病害尤其是小麦赤霉病的主要致病菌。小麦赤霉病一直是中国江淮流域,西南冬麦区和东北春麦期最重要的小麦病害之一^[1]。目前,病原菌的抗药性已使我国面临用多菌灵等苯并咪唑类杀菌剂防治小麦赤霉病和水稻恶苗病失效的问题^[1~6],研究开发其替代药物势在必行。

氟烯菌酯(2-氟基-3-氨基-3-苯基丙烯酸乙酯, 试验号: JS399-19)是由国家南方农药创制中心江苏基地于1998年合成的一种对镰刀菌具有较高专化活性的化合物,特别是对禾谷镰孢菌菌丝生长具有强烈的抑制活性^[7]。该产品2001年进入田间示范试验,显示出防治小麦赤霉病的良好市场前景。目前已获得中国发明专利,2005年完成农药临时登记,成为具有自主知识产权的新型杀菌剂。但该药剂对禾谷镰孢菌分生孢子萌发的影响还不明确。作者对经该药剂处理后的禾谷镰孢菌分生孢子萌发过程中孢子的细胞形态、芽管的伸长及萌发方式、有无膨大、扭曲等形态毒理学特征进行观察,初步探索了其孢子萌发过程的影响方式,旨在为研究该药剂的作用机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

菌株:对氟烯菌酯敏感的单孢分离的野生型菌株 S1、S2、S3、S7、2021 和对氟烯菌酯的抗性菌株 Y2021 和 Y2021A。敏感菌株在 $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的氟烯菌酯处理下生长完全受抑制,而抗性菌株在 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的氟烯菌酯处理下仍可生长。

药剂:95% 氟烯菌酯(JS399-19)原药(国家农药创制中心江苏基地提供),以甲醇为溶剂分别配成 1.0×10^4 和 $4.0 \times 10^4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 母液备用。

培养基:马铃薯蔗糖琼脂培养基(PSA)用于菌株的分离、纯化、一般培养与保存。3% 绿豆汤培养液^[6]用于菌株产生分生孢子。

1.2 氟烯菌酯对敏感和抗性禾谷镰孢菌菌丝生长的影响

采用菌丝生长速率法^[2],分别在含氟烯菌酯 0、0.025、0.05、0.10、0.20、0.40、0.80、1.60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的

PSA 平板上测定氟烯菌酯对敏感菌株菌丝生长的抑制作用,在含氟烯菌酯 0、25、50、100、200、400、800、1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PSA 平板上测定氟烯菌酯对抗性菌株菌丝生长的抑制作用。每处理重复3次,试验重复2次,置于25℃培养箱中培养3d。根据各浓度处理下药剂对菌丝生长的抑制率,求出氟烯菌酯在 PSA 培养基上抑制菌丝生长的有效中浓度 EC_{50} 。

1.3 氟烯菌酯对禾谷镰孢菌分生孢子萌发率的影响

将菌株在3% 绿豆汤培养基中振荡培养7d(25℃、光照12h/d、150r/min),在无菌条件下,用灭菌纱布滤去菌丝,将滤液在4000r/min下离心10min,去除上清液。将分生孢子重新悬浮于灭菌的去离子水中,调节孢子浓度至 10^5 个/mL 制备成孢子悬浮液,取其0.1mL涂布于含0.01、0.5、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氟烯菌酯的水琼脂(WA)平板(直径9cm)上,置于25℃培养箱中,分别观察4、6、8、10和12h后敏感菌株和抗性菌株的孢子萌发率。

1.4 氟烯菌酯对分生孢子芽管伸长、孢子萌发方式及其孢子和芽管形态的影响

按照1.3节方法制备孢子悬浮液,取其0.1mL涂布于含不同浓度氟烯菌酯的WA平板(直径9cm)上,置于25℃培养箱中。分别于6h和8h后测定敏感菌株和抗性菌株分生孢子芽管的长度;于12h后测定敏感菌株和抗性菌株分生孢子从中间细胞或基部细胞萌发的比率;于8h和12h后观察敏感菌株和抗性菌株的分生孢子及其芽管的形态,菌丝体的形成,有无畸形、膨大、扭曲等^[8、9]。

1.5 数据分析

采用SAS软件,对药剂影响禾谷镰孢菌分生孢子芽管生长的数据进行差异显著性分析(LSD法)。

2 结果与分析

2.1 氟烯菌酯对禾谷镰孢菌野生敏感菌株的毒力

表1为氟烯菌酯对5个野生敏感菌株和两个抗性菌株的回归方程、 EC_{50} 及 EC_{90} 值。结果表明,

氟烯菌酯对禾谷镰孢菌敏感菌株的菌丝生长有很好的抑制作用, EC_{50} 值在 $0.092 \sim 0.141 \mu\text{g/mL}$

之间, 而对两个抗性菌株的 EC_{50} 值较高, 分别为 111.052 和 $186.490 \mu\text{g/mL}$ 。

表 1 氟烯菌酯对禾谷镰孢菌野生敏感菌株和抗性菌株菌丝生长的抑制作用
Table 1 Inhibitory effect of JS399-19 against mycelia growth of sensitive wild-type and resistant isolates of *Fusarium graminearum*

菌株* Strains	回归方程 Regress equation	相关系数 r	EC_{50} /($\mu\text{g/mL}$)	EC_{90} /($\mu\text{g/mL}$)
S1	$Y = 6.861 + 2.188x$	0.987	0.141	0.544
S2	$Y = 6.115 + 1.306x$	0.912	0.140	1.341
S3	$Y = 6.875 + 1.937x$	0.994	0.108	0.494
S7	$Y = 6.562 + 1.510x$	0.977	0.092	0.652
2021	$Y = 6.896 + 1.890x$	0.990	0.099	0.473
Y2021	$Y = 0.852 + 2.027x$	0.995	111	476
Y2021A	$Y = 0.287 + 2.076x$	0.998	186	772

* S1, S2, S3 和 S7 是对氟烯菌酯敏感的菌株, Y2021 和 Y2021A 是对氟烯菌酯具有抗性的菌株。

* S1, S2, S3 and S7 were wild-type isolates sensitive to JS399-19, Y2021 and Y2021A were resistant isolates to JS399-19.

2.2 氟烯菌酯对禾谷镰孢菌分生孢子萌发速率的影响

药剂处理下, 野生敏感菌株和抗性菌株的分生孢子在 12 h 后均可萌发, 且萌发率与对照无显著差异。但随着药剂浓度的提高, 敏感菌株的萌发速率减慢, 尤其是高浓度处理, 只有在 6 h 后才

有少数孢子萌发; 而对于抗性菌株, 低浓度药剂处理反而促进了孢子的萌发, 其萌发速率高于对照, 在 50 和 $100 \mu\text{g/mL}$ 药液处理下孢子萌发速率有所减慢, 但在 8 h 后几乎与对照相同 (图 1)。说明药剂可以减慢孢子的萌发速率, 但 8 h 后则不能抑制孢子的萌发率。

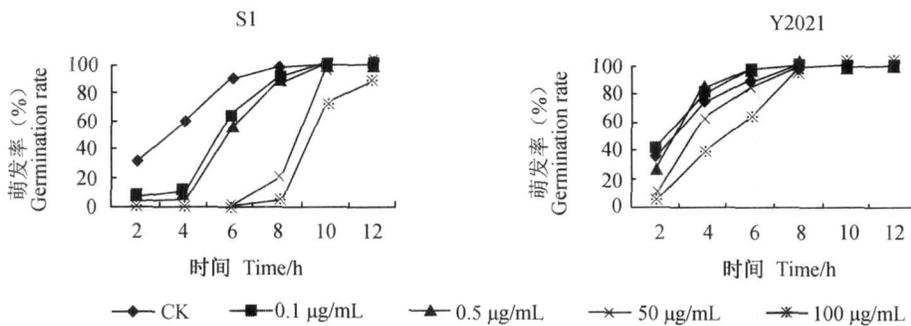


图 1 氟烯菌酯对禾谷镰孢菌敏感 (S1) 和抗性 (Y2021) 菌株分生孢子萌发速率的影响

Fig. 1 Effect of JS399-19 on the conidia germination rate of the sensitive isolate (S1) and the resistant isolate (Y2021) of *F. graminearum*

2.3 氟烯菌酯对禾谷镰孢菌分生孢子芽管伸长的抑制作用

虽然用氟烯菌酯处理 8 h 后并没有抑制孢子的萌发率, 但对于已经萌发的敏感菌株的分生孢子而言, 其芽管的伸长受到很大程度的抑制, 处理 8 h 后, 随着药剂浓度的提高, 芽管伸长受抑制的程度更强烈; 而药剂处理抗性菌株的分生孢子 8 h 后, 低浓度处理反而促进了芽管的伸长, 说明氟烯菌酯对抗性菌株分生孢子芽管伸长的抑制作用很

小 (表 2)。

2.4 氟烯菌酯对禾谷镰孢菌分生孢子中间细胞萌发的影响

在正常情况下, 芽管是从分生孢子的顶端细胞萌发的, 从基部细胞和中间细胞产生芽管的能力很低^[10]。不同浓度氟烯菌酯处理 12 h 后, 敏感菌株和抗性菌株的分生孢子萌发率都接近 100%, 但随着药剂浓度的提高, 敏感菌株和抗性菌株的分生孢子从中间细胞和基部细胞萌发的比率增

加,在敏感菌株中表现尤为显著(图2)。说明该药剂使禾谷镰孢菌分生孢子处在逆境中,从而影响了其萌发方式。

表2 不同浓度氟烯菌酯处理禾谷镰孢菌不同菌株分生孢子6h和8h后的芽管长度比较(单位: μm)

Table 2 Comparison of the germ tube length of different isolates of *F. graminearum* treated with JS399-19 at different concentrations for 6 h and 8 h (Unit μm)

菌株 Isolates	6 h			8 h		
	CK	0.1 $\mu\text{g/mL}$	0.5 $\mu\text{g/mL}$	CK	0.1 $\mu\text{g/mL}$	0.5 $\mu\text{g/mL}$
S1	45.47 \pm 6.57 aA*	24.09 \pm 4.45 bB	11.14 \pm 3.82 cC	90.95 \pm 8.69 aA	47.86 \pm 5.74 bB	25.42 \pm 3.26 aA
S2	45.16 \pm 6.04 aA	22.68 \pm 3.60 bB	12.83 \pm 3.71 cC	93.39 \pm 9.33 aA	43.42 \pm 4.32 bB	28.16 \pm 3.06 aA
S3	44.94 \pm 6.25 aA	22.37 \pm 3.92 bB	10.71 \pm 2.01 cC	95.93 \pm 7.21 aA	46.93 \pm 5.65 bB	26.84 \pm 4.67 aA
S7	44.20 \pm 6.25 aA	21.62 \pm 3.82 bB	12.08 \pm 3.60 cC	93.70 \pm 8.80 aA	44.78 \pm 5.54 bB	29.13 \pm 4.20 aA
Y2021	38.90 \pm 4.77 bB	58.55 \pm 8.59 aA	61.30 \pm 7.74 aA	76.74 \pm 7.53 bB	89.36 \pm 8.77 aA	95.90 \pm 7.64 aA
Y2021A	41.66 \pm 3.18 bB	54.20 \pm 6.15 aA	50.88 \pm 4.35 aA	71.41 \pm 6.89 bB	93.91 \pm 8.35 aA	91.66 \pm 7.18 aA

* 同一列数据后带有相同字母表示数据之间无显著性差异 ($\alpha P = 0.05$; A: $P = 0.01$)。

* Data in a column followed by the same letters indicate no significant difference between the data ($\alpha P = 0.05$; A: $P = 0.01$).

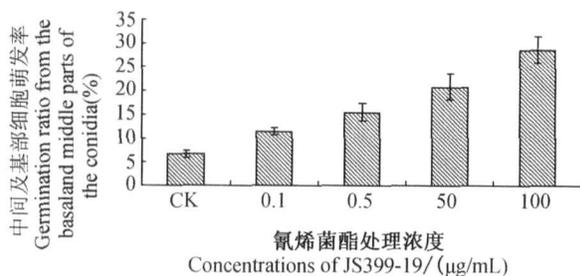


图2 氟烯菌酯处理使禾谷镰孢菌敏感菌株分生孢子的芽管从基部细胞和中间细胞萌发的比率增加

Fig. 2 The increasing rate of tubes germinated from the basal and the middle of the spores treated with JS399-19

2.5 氟烯菌酯对禾谷镰孢菌分生孢子及其芽管的致畸作用

氟烯菌酯处理禾谷镰孢菌分生孢子8h和12h后观察发现,敏感菌株和抗性菌株均可以萌发,但敏感菌株的分生孢子畸形,其细胞有肿胀现象,同时其萌发出的芽管也有膨大和扭曲等现象(图3)。而氟烯菌酯对抗性菌株的致畸作用不明显。说明在供试药剂浓度下,氟烯菌酯对该菌株表现出抑菌作用,它虽然不能杀死分生孢子,但可降低孢子萌发速率,并使分生孢子细胞及其萌发出的芽管畸形,进而可以降低其侵染寄主的能力,达到有效防治小麦赤霉病的目的。

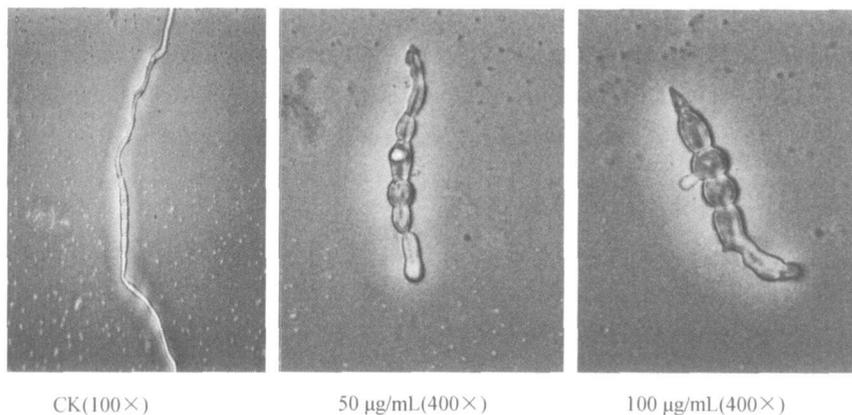


图3 50和100 $\mu\text{g/mL}$ 氟烯菌酯处理敏感菌株8h后的分生孢子及其芽管畸形

Fig. 3 Abnormality of conidia and their germ tubes of the sensitive isolate treated with 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$ of JS399-19 for 8 h

3 结论

作者研究了氟烯菌酯对禾谷镰孢菌分生孢子萌发过程的影响。氟烯菌酯对禾谷镰孢菌敏感菌株的菌丝生长具有很强的抑制作用。低浓度氟烯菌酯(0.1、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)处理可以减慢禾谷镰孢菌敏感菌株分生孢子的萌发速率,但12 h后的萌发率与对照相比无显著差异,此外,它能强烈地抑制已萌发孢子芽管的伸长生长,导致分生孢子及其芽管畸形。氟烯菌酯对抗性菌株菌丝生长的抑制作用较弱,且低浓度处理反而能够刺激孢子的萌发,萌发速率高于对照,12 h后萌发率与对照没有显著差异,只是高浓度氟烯菌酯(50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)能够降低抗性菌株分生孢子的萌发速率,但12 h后则无影响,对其分生孢子及其芽管的致畸作用不明显。因此,在供试浓度下,氟烯菌酯主要表现为抑菌作用,主要表现为抑制菌丝的生长并且降低禾谷镰孢菌分生孢子萌发的速率。本研究发现,氟烯菌酯的致畸作用主要表现为导致禾谷镰孢菌分生孢子细胞的膨大、畸形,芽管肿胀扭曲,伸长生长受到强烈的抑制,使芽管分生孢子从基部细胞萌发和中间细胞萌发的比率增加。

最新对氟烯菌酯的研究表明,该药剂对禾谷镰孢菌菌丝生长具有很强的抑制活性,对小麦赤霉病的治理显示出了良好的防效^[11~13]。研究该药剂的作用机理,对于合理开发和改善该类药剂,治理国内小麦种植区赤霉病的抗性具有重要的指导意义和实际应用价值。本文为研究该药剂的形态毒理学奠定了一定的基础,但其作用机理还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] ZHOU M ing-guo(周明国), WANG Jian-x in(王建新). 禾谷镰孢菌对多菌灵的敏感性基线及抗药性菌株生物学性质研究[J]. Acta Phytopathologica Sinica (植物病理学报), 2001, 31: 365-370
- [2] ZHOU M ing-guo(周明国), YE Zhong-y in(叶钟音), LIU Jing-fen(刘经芬). 杀菌剂抗药性研究进展[J]. Nanjing Agric Univ(南京农业大学学报), 1994, 17 (3): 33-41

- [3] WANG Jian-x in(王建新), ZHOU M ing-guo(周明国), LU Yue-jian(陆悦健), et al 小麦赤霉病菌抗药性群体动态及其治理药剂[J]. J Nanjing Agric Univ(南京农业大学学报), 2002, 25 (1): 43-47.
- [4] YUAN Shan-kui(袁善奎), ZHOU M ing-guo(周明国). 玉蜀黍赤霉的营养亲和性及其对多菌灵的抗性在菌丝融合过程中的遗传[J]. J Nanjing Agric Univ(南京农业大学学报), 2004, 27 (2): 39-42
- [5] YUAN Shan-kui(袁善奎), ZHOU M ing-guo(周明国). 玉蜀黍赤霉(*Gibberella zeae*)对多菌灵的抗药性遗传研究[J]. Acta Genetica Sinica(遗传学报), 2003, 30: 474-478
- [6] YUAN S K, ZHOU M G. A Major Gene for Resistance to Carbendazim in Field Isolates of *Gibberella zeae* [J]. Canadian J Plant Pathol, 2005, 27: 58-63.
- [7] WANG Long-gen(王龙根), NI Jue-ping(倪琨萍), WANG Feng-yun(王凤云), et al 新杀菌剂 JS399-19的生物活性研究[J]. Agrochemicals(农药), 2004, 43: 380-383.
- [8] CHEN Chang-jun(陈长军), ZHOU M ing-guo(周明国), YE Zhong-y in(叶钟音), et al 二硫氰基甲烷对水稻恶苗病菌菌体作用机理研究[J]. Acta Phytopathologica Sinica(植物病理学报), 2003, 33 (1): 48-51.
- [9] CHEN Chang-jun(陈长军), ZHOU M ing-guo(周明国), WANG Jian-x in(王建新), et al 二硫氰基甲烷对啤酒酵母的影响[J]. J Nanjing Agric Univ(南京农业大学学报), 2004, 27 (1): 51-54.
- [10] JELITTO T C, PAGE H A, READ N D. Role of External Signals in Regulating the Pre-penetration Phase of Infection by the Rice Blast Fungus *Magnaporthe grisea* [J]. Planta, 1994, 194: 471-477.
- [11] LI Heng-ku(李恒奎), ZHOU M ing-guo(周明国), WANG Jian-x in(王建新), et al 氟烯菌酯防治小麦赤霉病及治理多菌灵抗药性研究[J]. Agrochemicals(农药), 2006, 45(2): 92-94.
- [12] LI Heng-ku(李恒奎), CHEN Chang-jun(陈长军), WANG Jian-x in(王建新), et al 禾谷镰孢菌对氟烯菌酯的敏感性基线及室内抗药性风险初步评估[J]. Acta Phytopathologica Sinica(植物病理学报), 2006, 36: 273-278
- [13] LI Heng-ku(李恒奎), ZHOU M ing-guo(周明国). 氟烯菌酯对禾谷镰孢菌的生物活性及其内吸输导性研究[J]. Chin J Pestic Sci(农药学报), 2006, 8 (1): 30-35

(Ed. JIN SH)