农药学学报 2007, 9(4): 376-382
Chinese Journal of Pesticide Science

·研究论文·

丁吡吗啉对致病疫霉的作用机制初探

黄雄英[1,3], 袁会珠[*1], 覃兆海[*2], 陈小霞[1], 齐淑华[1]

(1.中国农业科学院 植物保护研究所 农业部农药化学与应用技术重点开放实验室,北京 100094;
2.中国农业大学 理学院,北京 100094; 3.湖南农业大学,长沙 410128)

摘 要:丁吡吗啉(pyrimorph)是一种结构新颖的杀菌剂,室内生物测定结果表明,其对致病疫霉Phytophthora infestans的菌丝生长、孢子囊产生、休止孢萌发具有较强的抑制作用,其EC_{50}值分别为0.066、0.059和0.550 μg/mL,但对游动孢子释放的抑制作用较弱,其EC_{50}值为9.78 μg/mL。显微镜下观察结果表明,经丁吡吗啉处理后的菌丝分枝相对较少,分枝间距拉长,但对菌丝直径无影响;从致病疫霉对番茄叶片的侵染过程来看,丁吡吗啉浓度为100 μg/mL时,处理24 h后在叶片表面只能看到少量休止孢萌发,96 h后未产生孢子囊。丁吡吗啉在1 μg/mL和10 μg/mL时对菌丝体细胞膜的电导率无影响,但当浓度为50 μg/mL时其电导率值明显上升;初步测定结果表明,在100 μg/mL浓度下,其对致病疫霉菌丝体的蛋白质合成有一定的抑制作用,但对其菌丝体内的DNA合成没有明显的抑制作用。

关键词:丁吡吗啉;致病疫霉;生物活性;作用机制
中图分类号: S482.2; S481.1 **文献标志码**: A **文章编号**: 1008-7303(2007)04-0376-08

Preliminary Studies on the Mode of Action of Pyrimorph against Phytophthora infestans

HUANG Xiong-ying[1,3], YUAN Hui-zhu[*1], QIN Zhao-hai[*2], CHEN Xiao-xia[1], QI Shu-hua[1]

(1. Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100094, China; 2. Colloge of Science, China Agricultural University, Beijing 100094, China; 3. Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: Pyrimorph is a novel fungicide developed by China Agricultural University and Institute of Plant Protection. Bioassay of pyrimorph to Phytophthora infestans was conducted. The results showed that the toxicity of pyrimorph was high in controlling P. infestans. It could intensively inhibit the mycelium growth, sporangium production and cystospore germination of P. infestans and the EC_{50} value was 0.066, 0.059 and 0.550 μg/mL, respectively. It was insufficient in inhibiting the release of zoospores from sporangia and the EC_{50} value was 9.78 μg/mL. Microscopic observation of pyrimorph treatment showed that the mycelium branch was fewer and the space was longer than that of CK. The difference of hypha diameter was not distinct between pyrimorph treatment and CK. When P. infestans invaded inside tomato leaves, it showed that only a few cystospores germinated 24 hours after inoculation and there was no sporangium 96 hours after inoculation of pyrimorph treatment at 100 μg/mL. Pyrimorph was found to influence on the permeability of the cell membrane of P. infestans at 50 μg/mL, and the

收稿日期: 2007-05-10; **修回日期**: 2007-10-30.
作者简介:黄雄英(1979-),女,硕士研究生; *通讯作者(Author for correspondence):袁会珠(1967-),男,河北人,博士,研究员,主要从事农药药理和农药使用技术研究. **联系电话**: 010-62815941; **E-mail:** yuanhuizhu@mail.china.com;覃兆海(1965-),男,湖北人,博士,教授,主要从事农药分子设计研究. **联系电话**: 010-62732958, **E-mail:** qinzhaohai@263.net
基金项目:国家重点基础研究发展计划(973计划)(2003CB114403);国家科技支撑计划项目(2006BAE01A03-10).

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

difference was not distinct at 1 μg/mL and 10 μg/mL. It showed that pyrimorph had some effect on the protein biosynthesis of P. infestans at 100μg/mL, but had little effect on the DNA biosynthesis.
Key words: pyrimorph; Phytophthora infestans; biological activity; action mode

丁吡吗啉(pyrimorph)是在烯酰吗啉化学结构的基础上采用模拟方法合成的一种新型杀菌剂,化学名:(E)-3-(2氯吡啶-4基)-3-(4叔丁基苯基)丙烯酰吗啉[1]。室内生物测定结果表明,在离体条件下,丁吡吗啉对致病疫霉 Phytophthora infestans、辣椒疫霉 Phytophthora capsici、立枯丝核菌 Rhizoctonia solani和古巴假霜霉 Pseudoperonospora cubensis等重要植物病原菌均有很好的抑制活性;室内盆栽试验结果表明,丁吡吗啉对番茄晚疫病具有较好的保护作用和一定的持效期[1]。

致病疫霉是重要的植物病原,其世代短、产孢量大、潜育期短、再侵染次数多,对寄主植物的破坏性强,流行速度快,其所引起的番茄晚疫病和马铃薯晚疫病均是世界毁灭性的蔬菜病害,在美国、加拿大、墨西哥、法国、瑞士、澳大利亚等国家均有报道。在我国河北、云南、山东等省地也普遍发生,可造成蔬菜减产 10%～30%,严重时可达 80%,甚至绝产[2,3]。已有研究表明,烯酰吗啉作为致病疫霉防治药剂,可强烈抑制游动孢子囊的形成、休止胞萌发和菌丝生长[3]。虽然丁吡吗啉和烯酰吗啉都含有吗啉环,但烯酰吗啉的主要活性基团并非吗啉环[2],推测丁吡吗啉对致病疫霉的作用机制与烯酰吗啉可能存在差异。所以,作者以烯酰吗啉为对照药剂,探索了丁吡吗啉对致病疫霉的作用机制,旨在为丁吡吗啉作用靶标研究及其田间应用提供依据。

1　材料与方法

1.1　供试材料

1.1.1　供试药剂　96%丁吡吗啉(pyrimorph)原药,由中国农业大学理学院合成;96.2%烯酰吗啉(dimethomorph)原药,安徽丰乐农化有限责任公司产品。

1.1.2　供试菌种　致病疫霉 Phytophthora infestans,中国农业科学院植物保护研究所保存。

1.1.3　供试培养基　黑麦蔗糖琼脂培养基(RYE-A):黑麦 60 g,蔗糖 20 g,琼脂 20 g,蒸馏水 1 000 mL,用于培养致病疫霉[1]。

1.1.4　试剂及仪器　牛血清白蛋白(BSA)和考马斯亮蓝 G-250,购自北京拜尔迪生化试剂生物公司。78-1型电热恒温培养箱,湖北省黄石市医疗器械厂;DDS-11A数显电导率仪,上海精密仪器仪表有限公司;RC5C-PLUS高速冷冻离心机,美国杜邦(Dupoint)公司;Hitachi U2000紫外分光光度计,日立公司;Nikon光学显微镜,上海精密仪器仪表有限公司;Sigma 1-13离心机,德国 Sigma公司。

1.2　试验方法

1.2.1　丁吡吗啉对致病疫霉无性阶段的影响

1.2.1.1　丁吡吗啉对致病疫霉游动孢子释放的影响[3,4]　采用载玻片上孢子萌发法。向黑麦培养基中培养 10～14 d已产生孢子囊的菌落中注入 5～10 mL 灭菌蒸馏水,制成孢子囊悬浮液(1×10^4个/mL)。用丙酮将丁吡吗啉原药配成 1×10^3 μg/mL 的母液,再用含 0.2%吐温-20的蒸馏水配制成系列浓度药液。将 20 μL 浓度为 1、5、10、25、50和 100 μg/mL 的丁吡吗啉药液与等量的孢子囊悬浮液混合后滴于载玻片上(即含药 0.5、2.5、5.0、12.5、25和 50 μg/mL),置于培养皿中保湿,于 4℃冰箱中培养 3 h,以促进游动孢子释放,在显微镜下观察孢子囊的空囊率。以烯酰吗啉为对照药剂,重复 3次。

采用式(1)计算药剂对致病疫霉游动孢子释放的抑制率,采用机率值分析法计算药剂抑制游动孢子释放的有效中浓度(EC_{50})。

$$\text{抑制率}(\%)=\frac{\text{CK游动孢子释放率}-\text{处理游动孢子释放率}}{\text{CK游动孢子释放率}}\times 100 \quad (1)$$

1.2.1.2　丁吡吗啉对致病疫霉菌丝生长及孢子囊产生的影响[3,4]　用 1.2.1.1节配制的丁吡吗啉母液配制系列浓度的含药培养基,以烯酰吗啉为对照药剂,并设空白对照。重复 3次。用打孔器(Φ 5 mm)在培养 8 d的菌落边缘截取致病疫霉菌饼,接种于含药培养基的培养皿中央,置于 24℃的恒温培养箱中黑暗培养 10 d,然后每皿注入 10 mL 无菌水洗下孢子囊,吸取 1 μL 于显微镜下

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

观察其孢子囊的数量,每处理重复 5次。

1.2.1.3 丁吡吗啉对致病疫霉休止孢萌发的影响[4,5] 采用载玻片萌发法。配制系列浓度的药液,将获得的孢子囊悬浮液于 4℃冰箱中放置 2 h,以促进游动孢子释放,调整游动孢子浓度至 5×10^4 个/mL,将等量的孢子悬浮液与药液混合后滴于载玻片上,于培养皿中保湿(12℃)培养 12 h,在显微镜下观察休止孢萌发情况。以烯酰吗啉为对照药剂,并设空白对照,重复 3次。

1.2.1.4 丁吡吗啉对致病疫霉的抑菌方式[6] 将丁吡吗啉加入 RYE-A中,分别配成 1、10和 50 μg/mL的含药培养基平板。接种菌饼后置于 24℃恒温条件下培养。7 d后,将菌饼转移到不含药的 RYE-A平板上,继续培养 5 d。如果完全被抑制的菌饼在转移后可见菌丝生长,则说明对致病疫霉有抑菌作用;若致病疫霉完全不生长,则说明有杀菌作用。

1.2.1.5 丁吡吗啉对致病疫霉菌丝生长量的影响[5] 将药液加入 RYE-A培养液中,配成系列浓度的含药培养液,打取直径为 5 mm的菌饼,每处理加入 5个菌饼,重复 3次,置于 24℃的恒温条件下静止培养 7 d,收集菌丝体,用蒸馏水冲洗 3～4次,于 60℃的干燥箱中烘干,称量菌丝质量,按式(2)计算药剂对菌丝生长的抑制率。

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\text{对照菌丝干重} - \text{处理菌丝干重}}{\text{对照菌丝干重}} \times 100 \qquad (2)$$

1.2.1.6 丁吡吗啉对致病疫霉菌丝形态的影响[5] 在浓度为 0.5、1和 5 μg/mL的含药培养基平板上培养菌丝,观察菌落形态,并在菌落边缘切取 1 cm^2的菌丝琼脂块,于显微镜下观察其形态变化,测量菌丝直径及主菌丝上两分支菌丝之间的间距,每处理观察 5个制片,共计 20个视野。

1.2.1.7 丁吡吗啉对致病疫霉侵染过程的影响[5]

植株处理与取样:将 1.2.1.1节配制的丁吡吗啉母液配制成 100和 400 μg/mL的药液。选择生长一致的番茄健苗,叶面喷雾,24 h后喷雾接种游动孢子悬浮液,并分别于接种后 24、48、72、96 h剪取番茄叶片(约 1 cm^2大小)。

组织透明、染色及观察:将剪取的番茄叶片置于装有 2 mL透明液的小瓶中脱色,每隔 12 h更换 1次透明液,直到组织完全透明;再将叶片组织置于染液中染色 5 min,制成临时玻片,于显微镜下观察药剂处理后致病疫霉侵染状况及侵染结构的变化。

透明液及染液的配制:透明液为甲醇 +三氯甲烷 =3 +1(混合液中含 0.15%三氯乙酸);染液为 15%三氯乙酸水溶液 +含 0.6%考马斯亮蓝的 99%甲醇溶液 =1 +1(均为体积比)。

1.2.2 丁吡吗啉对致病疫霉的作用机制研究

1.2.2.1 菌丝体制备 从 RYE-A培养基上培养的菌落边缘制取 φ 5 mm的菌饼,接入 20 mL RYE液体培养基中,于 24℃下静止培养 4 d,备用。

1.2.2.2 药剂对致病疫霉细胞膜通透性的影响[7] 采用电导率法测定。使用灭菌的蒸馏水配制浓度为 1.0、10.0、50.0 μg/mL的药液。将在黑麦液体培养基中培养 4 d的致病疫霉菌丝用布氏漏斗抽干其表面的培养液和水分,并用蒸馏水洗涤 3次,分别称取 2 g菌丝加到 20 mL上述系列浓度的药液中,以无菌蒸馏水为对照,在室温下,于 0、5、10、30、60、120和 180 min测定其电导率,重复 3次。

1.2.2.3 药剂对致病疫霉可溶性蛋白含量的影响 采用 Bradford的考马斯亮兰 G-250比色法[8]。在培养 7 d的致病疫霉菌丝培养液中分别加入丁吡吗啉至终浓度分别为 1、10和 100 μg/mL,继续培养 48 h,用布氏漏斗抽干菌体表面的培养液和水分,并用磷酸缓冲液(0.2 mol/L, pH 7.5)冲洗两次,称取菌丝体,加入 2 mL磷酸缓冲液和 1 g石英砂于研钵中,在冰浴中研磨至糊状,加磷酸缓冲液补足至 10 mL,于 4℃下离心(13 000 g)15 min,取上清液于 -20℃冰箱中保存备用。

按文献[8]方法制作标准曲线后进行样品的测定。

取 0.1 mL样品溶液加蒸馏水至 1 mL,再加入考马斯亮蓝 G-250试剂 5 mL,以 0.1 mL磷酸缓冲液加蒸馏水为空白对照,测定光密度 OD_{595}值,并按式(3)计算样品中的蛋白质含量。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

$$蛋白质含量(\mu g/g)=\frac{X\times 提取液总体积(mL)}{样品鲜重(\mu g/g)\times 取样体积(mL)} \quad (3)$$

式中:X为在标准曲线上查得的蛋白质含量(μg)。

1.2.2.4　药剂对致病疫霉DNA含量的影响[9]　在培养7 d的致病疫霉菌丝培养液中分别加入系列浓度的丁吡吗啉,继续培养48 h后用布氏漏斗抽干菌体表面的培养液和水分,菌丝保存于-20℃备用。DNA的提取采用CTAB法[9]。其提取试剂为:抽提缓冲液为50 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0),150 mmol/L NaCl,100 mmol/L EDTA (pH 8.0);20% SDS;5 mol/L NaCl;CTAB/NaCl为质量分数10%的CTAB溶于0.7 mol/L的NaCl溶液中;抽提液为苯酚∶氯仿∶异戊醇=25∶24∶1(体积比,下同),氯仿∶异戊醇=24∶1;无水乙醇;70%乙醇;TE缓冲液为10 mmol/L的Tris-HCl (pH 8.0),1 mmol/L EDTA (pH 8.0,含RNA酶20 ng/μL)。

按文献[9]步骤提取DNA。用紫外可见分光光度计检测DNA的纯度与浓度,若OD_{260}/OD_{280}比值在1.8～2.0之间,则说明DNA纯度合格。

2　结果与分析

2.1　丁吡吗啉对致病疫霉无性阶段的影响

2.1.1　丁吡吗啉对致病疫霉游动孢子释放的影响　实验结果表明,丁吡吗啉对致病疫霉游动孢子释放的抑制率随其浓度的增加而逐渐增大,当浓度为2.5 μg/mL时,抑制率为25.8%,当浓度为25 μg/mL时,抑制率达66.5%;而对照药剂烯酰吗啉在浓度为5 μg/mL时抑制率为28%,各浓度间抑制率增加并不明显。丁吡吗啉对致病疫霉游动孢子释放的有效中浓度(EC_{50})是9.78 μg/mL,而对照药剂烯酰吗啉的EC_{50}值大于52.6 μg/mL (表1)。

2.1.2　丁吡吗啉对致病疫霉孢子囊产生的影响　丁吡吗啉在低浓度下即能强烈抑制致病疫霉产生孢子囊,但是随着浓度的升高,药剂对孢子囊产生的抑制率并未呈现明显上升趋势,在浓度为0.01 μg/mL时抑制率为43.6%,浓度为1 μg/mL时抑制率为63.2%。线性回归分析结果表明,丁吡吗啉对产孢量的EC_{50}值为0.048 μg/mL,对照药剂烯酰吗啉的EC_{50}值是0.062 μg/mL。烯酰吗啉对孢子囊影响的回归直线的斜率明显大于丁吡吗啉,说明随着药剂浓度的升高,烯酰吗啉对孢子囊的抑制作用更强(见表1)。

2.1.3　丁吡吗啉对致病疫霉休止孢萌发的影响　丁吡吗啉和烯酰吗啉均能强烈地抑制致病疫霉休止孢的萌发,且其萌发率随药剂浓度的增加而逐渐下降。当浓度为2 μg/mL时,丁吡吗啉和对照烯酰吗啉的抑制率分别为73.1%和85.2%,其EC_{50}值分别为0.55和0.27 μg/mL (表1)。丁吡吗啉的抑制效果低于烯酰吗啉。

表1　丁吡吗啉对致病疫霉的影响

Table 1　Effect of pyrimorph against P. infestans

致病疫霉 P. infestans	丁吡吗啉 Pyrimorph			烯酰吗啉 Dimethomorph		
	回归方程 Regression equation (Y=)	相关系数 r	EC_{50}/(μg/mL)	回归方程 Regression equation (Y=)	相关系数 r	EC_{50}/(μg/mL)
游动孢子释放 Zoospore release from sporangia	0.902x+4.161	0.985	9.78	0.590x+3.984	0.971	52.85
孢子囊产生 Sporangia production	0.245x+5.323	0.989	0.048	0.904x+6.090	0.965	0.062
休止胞萌发 Cystospore germination	1.160x+5.298	0.972	0.55	1.190x+5.684	0.976	0.27
菌丝生长量 Mycelium growth	2.093x+7.467	0.980	0.066			

2.1.4　丁吡吗啉对致病疫霉菌丝生长量的影响　在含不同浓度丁吡吗啉的培养液中生长的致病疫霉菌丝生长量受到不同程度的抑制,直线回归分析结果见表1,药液处理浓度和对菌丝质量生长

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

的抑制率呈正线性关系,在 0.5 μg/mL 时,抑制率高达 96.2%。其 EC_{50}值为 0.066 μg/mL。

2.1.5 丁吡吗啉对致病疫霉的抑菌方式 经丁吡吗啉不同浓度处理后,10 μg/mL 的含药培养基上的菌饼长出少量菌丝,而 50 μg/mL 处理的含药培养基上的菌饼未长出菌丝,将各处理菌丝的菌饼转移到不含药培养基平板上培养,5 d后所有处理的菌丝均生长成与空白对照相同大小的菌落,表明丁吡吗啉在 50 μg/mL 下对致病疫霉只有抑菌作用。而将用 10 μg/mL 对照烯酰吗啉处理的菌饼(完全未长菌丝)转移至不含药培养基上后,发现致病疫霉完全不生长,说明烯酰吗啉在 10 μg/mL 以上就有杀菌作用。

2.1.6 丁吡吗啉对致病疫霉菌丝形态的影响 致病疫霉菌落在黑麦培养基上呈放射状扩展,在含不同浓度药液的培养基上,菌落生长受到不同程度的抑制。未用药剂的处理中,菌落较厚,菌丝紧贴培养基,气生菌丝相对较少。在含药培养基上生长的菌落,气生菌丝茂密,菌落呈棉絮状。显微镜下观察,正常生长的菌丝分枝较多,分枝间距较短(图 1A);而用药处理的菌丝,其分枝稀少,分枝菌丝细长,分枝间距较对照长(图 1B),但药剂不同浓度间差异不明显。用显微测微尺测量主菌丝的分枝菌丝间的间距(表 2),在浓度为 0、0.5、1、5 μg/mL 时,分枝间距分别为 74.75、86.88、90.25、92.07 μm。而药剂菌丝直径没有明显的抑制作用。

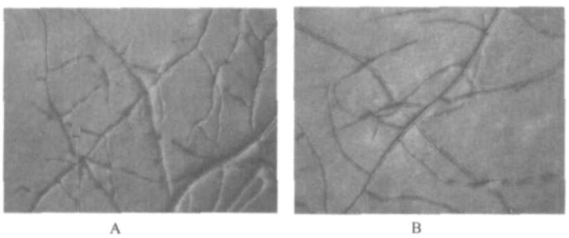

图 1 丁吡吗啉对致病疫霉菌丝形态的影响(放大倍数 10×20)

Fig. 1 Effect of pyrimorph on hyphal shape of P. infestans (10×20)

A:对照; B:1 μg/mL 的丁吡吗啉。A: CK; B: pyrimorph at 1 μg/mL.

2.1.7 丁吡吗啉对致病疫霉侵染过程的影响 显微观察结果(图 2)表明,CK接菌 24 h后,叶片表面聚集成堆的游动孢子萌发形成芽管(图 2A),48 h后,芽管继续伸长形成菌丝并在细胞间蔓延,72 h后,叶片表面出现大量菌丝,但未见孢子囊产生,肉眼可见叶片边缘呈现水渍状,96 h后,细胞间蔓延的菌丝体上产生大量的孢子囊(图 2C),肉眼可见叶片上出现大量白色菌丝,并且叶片已出现腐烂症状。

表 2 丁吡吗啉对致病疫霉菌丝形态的影响

Table 2 Effect of pyrimorph on hyphal diameter and space between mycelial branch

丁吡吗啉浓度 Pyrimorph concentration /(μg/mL)	菌丝分枝 Hypha branch /μm	菌丝直径 Hypha diameter /μm
0.5	86.88 b	1.91 a
1	90.25 b	1.88 a
5	92.07 b	1.87 a
CK	74.75 a	1.88 a

注:用 Duncan's新复极差法检验处理间的差异显著性,相同字母表示 0.05水平差异不显著。下同。

Note: Data in a column followed by the same letters are not significiantly different at $P_{0.05}$ by Duncan's multiple range test. The same as in the following tables.

经丁吡吗啉处理的叶片,当浓度为 100 μg/mL 时,接菌 24 h后,叶片表面有少量游动孢子萌发形成芽管(图 2B),48 h后偶见菌丝在细胞间蔓延,96 h后叶片上出现水渍状斑块,未出现白色菌丝,显微镜下可见菌丝在细胞间纵横交错(图 2D),未见孢囊梗及孢子囊产生。而浓度为 400 μg/mL 时,接菌 24 h后,偶见游动孢子萌发产生芽管,48~96 h间无明显变化,仅有极少量菌丝,未见孢子囊,肉眼观察叶片组织无异常变化。这一结果表明,药剂能抑制休止孢形成芽管,并能强烈抑制致病疫霉产生孢子囊,从而可以有效防止病原菌在田间的再侵染。

2.2 丁吡吗啉对致病疫霉的作用机理研究

2.2.1 丁吡吗啉对致病疫霉细胞膜通透性的影响 电导率的变化可反映细胞膜渗透性的改变。实验结果(图 3)显示,病原菌细胞膜的电导率均可随着处理时间的推移而升高,经丁吡吗啉处理后,在所测定的 180 min内,当药剂浓度为 1、10 μg/mL 时,其电解质渗漏率的变化幅度与对照相比差异不显著,而当浓度为 50 μg/mL 时,处理 10 min后,电解质渗漏率的变化幅度明显高于对照,表明在高浓度(>50 μg/mL)下,丁吡吗啉能够增加细胞膜的通透性,导致电解质渗漏。

2.2.2 丁吡吗啉对致病疫霉可溶性蛋白含量的影响 经丁吡吗啉处理 48 h后,在 1 μg/mL 和 10 μg/mL 浓度下,药剂对致病疫霉菌丝体内可溶性蛋白含量的影响与对照相比差异不显著,抑制率分别为 3.2%和 4.5%;当浓度为 100 μg/mL 时,药剂对菌丝体内可溶性蛋白质的合成有一定的抑制作用,抑制率为 21.7%(表 3)。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

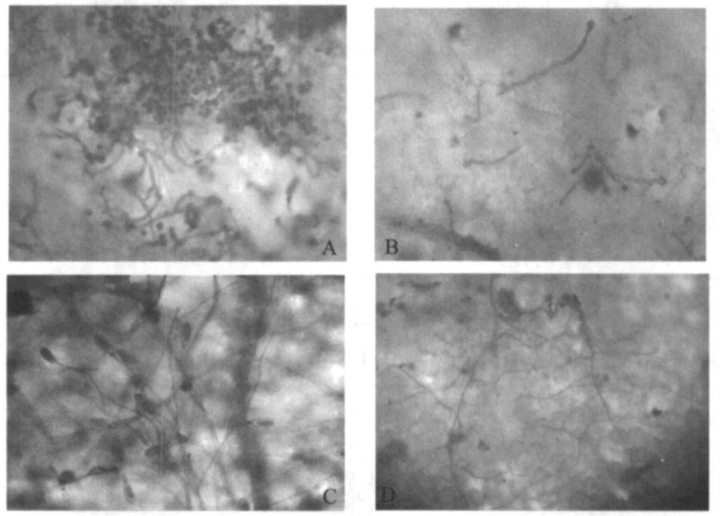

图 2　丁吡吗啉对致病疫霉侵染过程的影响(放大倍数 10 ×20)

Fig. 2　Effect of pyrimorph on invading process of P. infestans(10 ×20)

A:空白对照 CK(24 h); B:丁吡吗啉 100 μg/mL 处理 Pyrimorph at 100 μg/mL (24 h); C:空白对照 CK(96 h); D:丁吡吗啉 100 μg/mL 处理 Pyrimorph at 100 μg/mL (96 h).

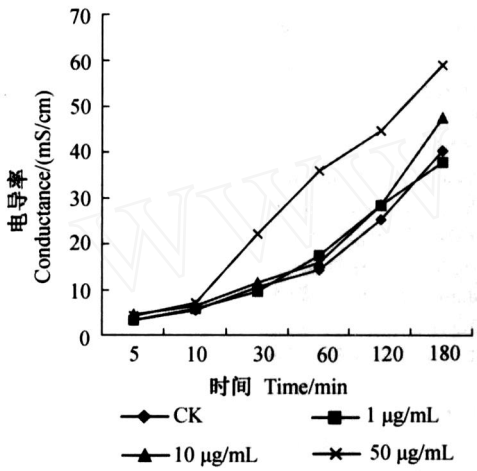

图 3　丁吡吗啉对致病疫霉细胞膜通透性的影响

Fig. 3　Effect of pyrimorph on membrane permeability of P. infestans

2.2.3　**丁吡吗啉对致病疫霉菌丝体 DNA 含量的影响**　采用紫外分光光度计法测定不同浓度药剂处理后菌丝体 DNA 的含量(表 4),可以看出,药剂处理后菌体 DNA 含量较空白对照有所下降,但差异不明显,说明该药剂可能不抑制菌丝体内 DNA 的合成。

3　结论与讨论

致病疫霉在寄主植物上的侵染过程可以分为孢子囊释放游动孢子、游动孢子游动、休止孢形成、休止孢萌发、附着胞形成、胞间菌丝的扩展和新一代孢子囊产生等几个阶段。离体研究结果表明,丁吡吗啉对致病疫霉的菌丝生长、孢子囊形成、休止孢萌发具有较强的抑制作用,其 EC_{50} 值分别为 0.066、0.059 和 0.55 μg/mL,但对游动孢子释放的抑制作用较弱,其 EC_{50} 值为 9.78 μg/mL。在致病疫霉对番茄叶片的侵染过程中,丁吡吗啉对休止孢的萌发及孢子囊的形成都具有强烈的抑制作用,用 100 μg/mL 的丁吡吗啉处理番茄叶片后接种致病疫霉,24 h后只有少量休止孢萌发,96 h后空白对照番茄叶片上产生了大量的孢子囊,而 100 μg/mL 丁吡吗啉药液处理的叶片上并未见孢子囊产生,进一步说明药剂对休止孢的萌发及孢子囊的产生具有极强的抑制作用。正常情况下,菌丝生长发育到一定时期,顶端形成孢囊梗,产生孢子囊,成熟的孢子囊释放出游动孢子形成再次侵染,丁吡吗啉能强烈抑制致病疫霉孢子囊的产生,从而大大减少了再侵染的来源,表明该药剂具有实用价值,可以作为防治晚疫病的有效药剂加以开发利用。

虽然丁吡吗啉和烯酰吗啉结构相似,都含有吗啉环[1,2],并且对致病疫霉休止孢的萌发及孢子囊的产生都具有显著的抑制作用[3],但从药剂对致病疫霉的抑菌方式来看,丁吡吗啉对致病疫霉有抑菌作用,而无杀菌作用;而烯酰吗啉则表现出很好的杀菌作用,说明两者在抑菌机理方面存在差异。鉴于丁吡吗啉对致病疫霉的抑菌方式与烯酰吗啉不同,其在田间的应用也可能存在差异,有必要进一步开展盆栽试验和田间试验,研究优化其田间使用技术[10]。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 3 丁吡吗啉对致病疫霉可溶性蛋白含量的影响

Table 3 Effects of pyrimorph on protein content of P. infestans mycelium

浓度 Concentration/(μg/mL)	OD值 OD value	蛋白质 Protein/(mg/g)	抑制率 Inhibition rate(%)
0	0.142	11.78 ±1.68 a	-
1	0.137	11.41 ±2.11 a	3.2
10	0.135	11.25 ±2.44 a	4.5
100	0.111	9.22 ±1.69 b	21.7

表 4 丁吡吗啉对致病疫霉菌丝体 DNA含量的影响

Table 4 Effects of pyrimorph on DNA content of P. infestans mycelium

浓度 Concentration/(μg/mL)	OD值 OD value			DNA /(μg/mL)
	I	II	III	
CK	1.92	1.96	1.87	7.17 ±1.03 a
1	1.94	1.88	1.92	6.13 ±0.90 a
10	2.01	1.95	1.83	5.66 ±1.10 a
100	1.89	1.90	1.96	5.41 ±0.52 a

丁吡吗啉在低浓度下对菌丝体细胞膜的电导率变化值与对照一致,但在高浓度下其电导率值明显上升,这可能是由于高浓度的药剂引起细胞膜的通透性发生改变,导致细胞内原生质渗漏,从而引起电导率增加[2, 7, 11]。已知烯酰吗啉是影响细胞壁的正确组装,从而造成细胞内物质的泄露[2],丁吡吗啉在高浓度下是否破坏了致病疫霉菌丝体细胞壁的正确组装,从而导致细胞内物质的泄露,值得通过电子显微镜观察进一步深入研究。

蛋白质是构成菌丝体不可缺少的成分,是病原菌生命活动的物质基础。本项研究结果初步表明,丁吡吗啉在低浓度处理后,致病疫霉菌丝体内的蛋白质含量(考马斯亮蓝法测定)没有明显的变化,在 100 μg/mL 处理后,其蛋白质含量明显低于空白对照,说明丁吡吗啉可能影响了致病疫霉蛋白质的生物合成,有必要进一步深入研究。

DNA是生命遗传物质,有些杀菌剂即是通过抑制遗传物质的生物合成而起到杀菌作用的[9, 11],本项研究结果初步表明,丁吡吗啉对菌丝体 DNA 的合成可能没有明显的抑制作用。

参考文献:

[1] CHEN Xiao-xia(陈小霞), YUAN Hui-zhu(袁会珠), QIN Zhao-hai(覃兆海), et al 新型杀菌剂丁吡吗啉的生物活性及作用方式探索[J]. Chin J Pestic Sci(农药学学报), 2007, 9(3): 229-234.

[2] HUANG Qing-chun(黄青春), YE Zhong-yin(叶钟音). 烯酰吗啉(DMM)的特性及其作用机制[J]. Pesticide Science and Administration(农药科学与管理), 2000, 21(5): 28-31.

[3] HUANG Xiong-ying(黄雄英), YUAN Hui-zhu(袁会珠), REN Xin-guo(任新国), et al 烯酰吗啉对番茄晚疫病菌的抑制活性[J]. Plant Protection(植物保护), 2006, 32(6): 45-47.

[4] MITANI S, ARAKI S, YAMAGUCHI T, et al. Antifungal Activity of the Novel Fungicide Cyazofamid against Phytophthora infestants and other Plant Pathogenic Fungi in vitro[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2001, 70: 92-99.

[5] FANG Zhong-da(方中达). Research Method for Plant Pathology. 3rd ed.(植病研究方法,第三版)[M]. Beijing(北京): China Agriculture Press(中国农业出版社), 1998: 12.

[6] JIANG Ji-zhi(蒋继志), ZHAO Li-juan(赵丽坤), SHI Juan(史娟). 几种真菌发酵液对致病疫霉的抑制作用[J]. Microbiology(微生物通报), 2001, 28(2): 55-59.

[7] DING Zhong(丁中), LIU Feng(刘峰), MU Li-yi(慕立义). 应用电导仪测定番茄灰霉病菌对多菌灵抗药性的初步研究[J]. Chin J Pestic Sci(农药学学报), 2003, 5(3): 94-96.

[8] BRADFORD M M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248-254.

[9] ZHU Jie-hua(朱杰华). Research on the Genetic Structure of Potato Late Blight (Phytophthora infestans) Population in China(中国马铃薯晚疫病菌群体遗传结构研究)[D]. Beijing(北京): Hebei Agricultutal University(河北农业大学), 2004.

[10] STEIN J M, KIRK W W. Field Optimazion of Dimethomorph for the Control of Potato Late Blight Phytophthora infestants: Application Rate, Interval, and Mixtures[J]. Crop Protection, 2003, 22: 609-614.

[11] WANG Wen-qiao(王文桥), LIU Guo-rong(刘国容). 卵菌对内吸性杀菌剂的抗药性及对策[J]. Acta phytopathologica Sinica(植物病理学报), 1996, 26(4): 294-296.

[12] CHEN Xiao-xia(陈小霞), YUAN Hui-zhu(袁会珠), WANG Qi(王琦). 内吸性杀菌剂对卵菌的作用机理及抗药性机理概述[C]// Advance in Plant Pathology(植物病理学研究进展). Beijing(北京): China Agriculture Science and Technology Press(中国农业科学技术出版社), 1997: 401-406.

(Ed. JIN S H)

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net