

雷帕霉素对 4 种植物病原真菌的抑菌活性

王彦¹, 徐曦¹, 张立钦², 王勇军^{*1}

(1. 浙江农林大学 林业与生物技术学院, 浙江 临安 311300;

2. 浙江农林大学 生物农药高效制备技术国家地方联合工程实验室, 浙江 临安 311300)

摘要: 采用菌丝生长速率法, 测定了雷帕霉素对番茄灰霉病菌、油菜菌核病菌、水稻纹枯病菌和棉花枯萎病菌的抑菌活性, 比较了啞菌酯、丙烷脒及雷帕霉素对番茄灰霉病菌的抑菌效果, 并通过电子显微镜观察了雷帕霉素对番茄灰霉病菌菌丝生长的影响。结果表明: 雷帕霉素对供试 4 种植物病原真菌菌丝均表现出了极强的抑制活性, 其中对油菜菌核病菌的抑制作用最强, EC_{50} 值为 $2.23 \times 10^{-4} \mu\text{g/mL}$, 对番茄灰霉病菌、水稻纹枯病菌和棉花枯萎病菌的 EC_{50} 值分别为 1.32×10^{-3} 、 4.05×10^{-3} 及 $3.82 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$; 雷帕霉素对番茄灰霉病菌菌丝的抑制活性显著高于啞菌酯 (EC_{50} 值为 $3.24 \mu\text{g/mL}$) 和丙烷脒 (EC_{50} 值为 $3.81 \mu\text{g/mL}$)。电镜观察发现, 经雷帕霉素处理后, 番茄灰霉病菌菌丝表现出提前衰老等症状。研究结果可为深入探讨雷帕霉素对植物病原真菌的作用机制奠定基础。

关键词: 雷帕霉素; 抑菌活性; 植物病原真菌; 番茄灰霉病菌

中图分类号: S481.9; S482.28 文献标志码: A 文章编号: 1008-7303(2016)03-0393-04

Antifungal activity of rapamycin against four kinds of plant pathogenic fungi

WANG Yan¹, XU Xi¹, ZHANG Liqin², WANG Yongjun^{*1}

(1. College of Forestry and Biotechnology, Zhejiang A&F University, Lin'an 311300, Zhejiang Province, China; 2. Local and National Joint Engineering Laboratory of Biopesticide High-Efficient Preparation, Zhejiang A&F University, Lin'an 311300, Zhejiang Province, China)

Abstract: Rapamycin is an important macrocyclic polyketide produced by *Streptomyces hygroscopicus*, which exhibited immunosuppressive and antifungal properties. In this study, antifungal activity of rapamycin against four kinds of plant pathogens, including *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, and *Fusarium oxysporum*, was assayed by the mycelium growth rate method. The results showed that rapamycin exhibited extreme significant inhibit efficacy against mycelial growth of all of these plant pathogens on the PDA medium. The EC_{50} value of rapamycin against *S. sclerotiorum* was $2.23 \times 10^{-4} \mu\text{g/mL}$, which is the lowest. The EC_{50} values against *B. cinerea*, *R. solani*, and *F. oxysporum* were 1.32×10^{-3} , 4.05×10^{-3} and $3.82 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$, respectively. It is noteworthy that the toxicity of rapamycin against the mycelial growth of *B. cinerea* is significantly higher than those of azoxystrobin and propamidine, with the EC_{50} values of 3.24 and 3.81 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The hypha of *B. cinerea* exhibited premature aging after treated with rapamycin under the scanning electron

收稿日期: 2016-01-19; 录用日期: 2016-04-18.

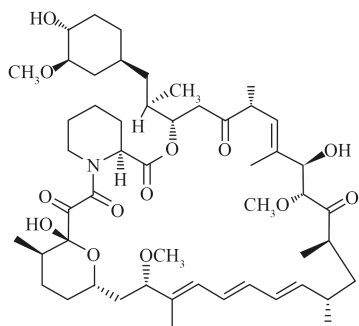
基金项目: 公益性行业 (农业) 科研专项 (201303106); 浙江省自然科学基金 (LY12C14006)。

作者简介: 王彦, 男, 硕士研究生, E-mail: wangyanmail@163.com; *王勇军, 通信作者 (Author for correspondence), 男, 副教授, 主要从事生物农药研发及植物病理研究, E-mail: wangyj@zafu.edu.cn

microscope. The results in this study provided the basis for investigating the efficient inhibition mechanism of rapamycin in the future study.

Keywords: rapamycin; antifungal activity; plant pathogenic fungi; *Botrytis cinerea*

雷帕霉素 (rapamycin) 是由吸水链霉菌产生的三十六元环含氮三烯大环内酯类抗生素, 其结构中包含非常特殊的被 α, β -二酮己哌啶胺分子所掩盖的半缩酮 (图式 1)。雷帕霉素最早在智利的复活节岛 (Easter Island) 上分离获得, 发现其对白色念珠菌、石膏样小孢子菌及颗粒发癣菌等真菌具有显著的杀菌活性^[1]。后来发现, 雷帕霉素还具有免疫抑制活性^[2]和抗排斥反应作用^[3], 由此引起了医学界的重视, 但其抗真菌研究反而因此被忽视。



图式 1 雷帕霉素结构式

Scheme 1 The molecular formula of rapamycin

雷帕霉素的主要作用机制表现在可与 FKBP 蛋白 (FK506-binding protein) 结合^[4], 然后再结合细胞的 TOR 激酶 (target of rapamycin) 形成复合体, 使 TOR 激酶失去磷酸化活性而失活。TOR 激酶负责调控细胞生长和凋亡, 其失活后, 细胞将呈现与饥饿和凋亡相似的生理表现^[5]。Meléndez 等^[6]发现, 雷帕霉素对番茄灰霉病菌具有明显拮抗活性, 并克隆得到了该病菌的 1 个 *BcFKBP12* 基因, 发现 *BcFKBP12* 基因缺失可导致番茄灰霉病菌对雷帕霉素的抗性。Teichert 等^[7]发现, 雷帕霉素对水稻恶苗病菌具有明显拮抗作用, 其可影响水稻恶苗病菌氮调控途径中的基因表达及细胞核糖体的合成。Yu 等^[8]发现, 雷帕霉素对小麦赤霉病菌具有明显抗菌活性, 可导致菌丝膨大扭曲, 隔膜变多, 菌丝内脂肪体积累。

本研究系统测定了雷帕霉素对番茄灰霉病菌、油菜菌核病菌、棉花枯萎病菌及水稻纹枯病菌 4 种重要植物病原真菌的抗菌活性, 比较了雷帕霉素与 2 种常用杀菌剂嘧菌酯和丙烷脒对番茄

灰霉病菌的抑制效果, 观测了雷帕霉素对病原菌菌丝生长的影响, 以期雷帕霉素对植物病原真菌的作用机制研究提供参考。

1 材料与方 法

1.1 菌株、药剂及主要仪器

番茄灰霉病菌 *Botrytis cinerea*、油菜菌核病菌 *Sclerotinia sclerotiorum*、水稻纹枯病菌 *Rhizoctonia solani* 和棉花枯萎病菌 *Fusarium oxysporum*, 均由浙江农林大学生物农药高效制备技术国家地方联合工程实验室分离、鉴定和保存。

98% 雷帕霉素 (rapamycin) 原药, 美国 BBI 公司, 用乙醇配制成 $1.0 \times 10^4 \mu\text{g/mL}$ 的母液。对照药剂: 93% 嘧菌酯 (azoxystrobin) 原药, 先正达公司, 用甲醇配制成 $1.0 \times 10^4 \mu\text{g/mL}$ 的母液; 95% 丙烷脒 (propamidine) 原药, 浙江禾本科技有限公司, 用甲醇配制成 $1.0 \times 10^3 \mu\text{g/mL}$ 的母液。试验时取各药剂母液, 用水稀释至所需浓度后供试。

Pro 扫描电子显微镜 (荷兰 Phenom Pro 公司)。

1.2 雷帕霉素对病原菌菌丝生长的毒力测定

采用菌丝生长速率法^[9]。根据预备试验结果, 将雷帕霉素药液添加到预热的 PDA 培养基中, 得到系列质量浓度分别为 0、 3.91×10^{-5} 、 7.81×10^{-5} 、 1.56×10^{-4} 、 3.13×10^{-4} 、 6.25×10^{-4} 、 1.25×10^{-3} 、 2.50×10^{-3} 、 5.0×10^{-3} 、0.01 及 0.02 $\mu\text{g/mL}$ 的含药培养基; 嘧菌酯和丙烷脒在含药培养基中的系列质量浓度为 0.20、0.39、0.78、1.56、3.13、6.25、12.5、25.0、50.0 及 100.0 $\mu\text{g/mL}$ 。制取直径 7 mm 的菌碟, 分别接种于含系列浓度雷帕霉素、嘧菌酯或丙烷脒的 PDA 培养基中央, 于 25 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2~15 d 后, 计算药剂对菌丝生长的抑制率。每处理重复 3 皿, 试验重复 3 次。

1.3 雷帕霉素对菌丝形态影响的扫描电镜观察

将番茄灰霉病菌接种至含系列浓度雷帕霉素的 PDA 培养基上, 25 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 4 d 后, 用刀片取菌落边沿的菌丝块 (30 mm \times 8 mm), 转移至 2 mL 离心管中, 加入质量浓度为 2.5% 的戊二醛, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下浸泡过夜。用 0.1 mol/L 的 PBS 缓冲液浸洗 15 min, 吸弃浸泡液, 重复 3 次。依次向离心管中加入体

积分数为 50%、70%、80%、90% 和 95% 的乙醇进行浸洗, 每次 15 min, 最后用 100% 的乙醇洗脱两次, 每次 20 min。用 $V(\text{乙醇}):V(\text{乙酸异戊酯})=1:1$ 的混合溶液浸泡 30 min, 再用体积分数 100% 的乙酸异戊酯浸泡 2 h。于临界点干燥, 镀金, 进行扫描电镜观察。

1.4 数据处理

试验数据采用 DPS v7.05 软件进行统计分析, 建立药剂质量浓度对数 (x) 与菌丝生长抑制率 (y) 之间的毒力回归方程 $y = a + bx$, 计算相关系数

(r) 及有效抑制浓度 (EC_{50} 和 EC_{95})。

2 结果与分析

2.1 雷帕霉素对菌丝生长的抑制效果

雷帕霉素对供试 4 种植物病原真菌菌丝生长均表现出了极强的抑制活性 (表 1), 其 EC_{50} 值最高仅为 $4.05 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$ 。其中对油菜菌核病菌的抑制作用最强, EC_{50} 值仅 $2.23 \times 10^{-4} \mu\text{g/mL}$; 对番茄灰霉病菌的 EC_{50} 值为 $1.32 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$, 也具有较高的抑制活性。

表 1 雷帕霉素对 4 种植物病原真菌菌丝生长的抑制作用

Table 1 Toxicities of rapamycin against the mycelial growth of plant pathogens

病原菌 Pathogen	毒力回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient, r	$EC_{50} (\pm SD)/(\mu\text{g/mL})$	$EC_{95} (\pm SD)/(\mu\text{g/mL})$
番茄灰霉病菌 <i>B. cinerea</i>	$y = 7.99 + 1.04x$	0.98	$1.32 \times 10^{-3} \pm 0.21 \times 10^{-3}$	$5.05 \times 10^{-2} \pm 1.24 \times 10^{-2}$
油菜菌核病菌 <i>S. sclerotiorum</i>	$y = 8.82 + 1.01x$	0.98	$2.23 \times 10^{-4} \pm 1.12 \times 10^{-4}$	$7.21 \times 10^{-3} \pm 5.7 \times 10^{-3}$
水稻纹枯病菌 <i>R. solani</i>	$y = 8.00 + 1.25x$	0.97	$4.05 \times 10^{-3} \pm 0.43 \times 10^{-3}$	$8.23 \times 10^{-2} \pm 2.04 \times 10^{-2}$
棉花枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i>	$y = 7.85 + 1.17x$	0.97	$3.82 \times 10^{-3} \pm 0.64 \times 10^{-3}$	$9.49 \times 10^{-2} \pm 1.98 \times 10^{-2}$

2.2 雷帕霉素、啞菌酯和丙烷脒的抑制作用比较

比较表 2 中结果发现, 啞菌酯和丙烷脒的 EC_{50} 值分别是雷帕霉素的 2 490 和 2 930 倍, EC_{95} 值也

呈现出相同数量级的差异, 表明雷帕霉素对番茄灰霉病菌菌丝生长的抑制效果远远高于啞菌酯和丙烷脒 ($P < 0.01$)。

表 2 雷帕霉素、啞菌酯和丙烷脒对番茄灰霉病菌菌丝生长的抑制作用

Table 2 Toxicities of rapamycin, azoxystrobin and propamidine against *B. cinerea*

药剂 Chemicals	毒力回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient, r	$EC_{50} \pm SD/(\mu\text{g/mL})$	$EC_{95} \pm SD/(\mu\text{g/mL})$
雷帕霉素 rapamycin	$y = 7.98 + 1.04x$	0.98	$1.32 \times 10^{-3} \pm 0.21 \times 10^{-3}$ a	$5.05 \times 10^{-2} \pm 1.24 \times 10^{-2}$ a
啞菌酯 azoxystrobin	$y = 4.08 + 1.85x$	0.98	3.24 ± 0.26 b	24.51 ± 1.94 b
丙烷脒 propamidine	$y = 4.34 + 1.17x$	0.99	3.81 ± 0.31 b	92.91 ± 8.36 b

注: 同列中不同字母表示在 0.01 水平下差异极显著 ($P < 0.01$)。

Note: Values with different letters within the same column have significant difference at 0.01 level ($P < 0.01$).

2.3 雷帕霉素对番茄灰霉病菌菌丝形态的影响

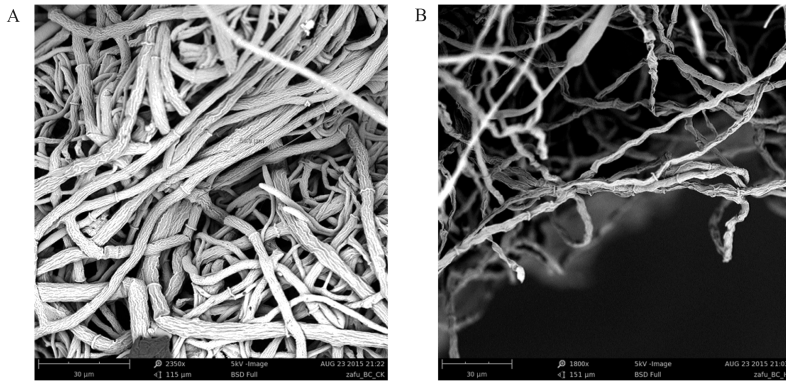
扫描电镜观察发现, 在 EC_{50} 浓度 ($1.32 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$) 雷帕霉素处理下, 番茄灰霉病菌菌丝逐渐变细, 透明度变差, 出现明显溢缩现象, 颜色变深, 表现出提前衰老症状 (图 1B); 而对照菌丝饱满, 生长旺盛 (图 1A)。表明雷帕霉素在很低浓度下即可显著破坏番茄灰霉病菌的菌丝结构。

3 结论与讨论

研究表明, 雷帕霉素对供试 4 种植物病原真菌菌丝生长均具有极显著的抑制活性。离体条件下, 其对番茄灰霉病菌、油菜菌核病菌、水稻纹枯病菌和棉花枯萎病菌的 EC_{50} 值均处于极低水

平, 对番茄灰霉病菌的 EC_{50} 值为 $1.32 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$, 抗菌活性远远高于啞菌酯和丙烷脒等化学农药^[10-11], 也高于水杨酸协同作用下的啞菌酯^[12]。本研究结果与 Teichert 等^[7]和 Yu 等^[8]报道的雷帕霉素对水稻恶苗病菌和小麦赤霉病菌的作用结果一致。电镜观察发现, 雷帕霉素能显著影响番茄灰霉病菌菌丝结构, 使菌丝呈现早期衰老症状, 这与其作用机制及作用方式相符。

目前对新型杀菌剂的开发研究主要围绕抑制细胞呼吸链、抑制细胞分裂及降低病原菌致病力等途径^[13-15]。而雷帕霉素通过结合细胞 TOR 激酶形成复合体, 使 TOR 激酶失去磷酸化活性而失活, 进而调控细胞的生长和凋亡^[4-5], 该机制尚未



A. 空白对照菌丝形态 (2 000×); B. 1.32×10^{-3} µg/mL 雷帕霉素处理后菌丝形态 (2 000×)。
A. Control under scanning electron microscope (2 000×); B. Treatment with 1.32×10^{-3} µg/mL rapamycin under scanning electron microscope (2 000×).

图 1 雷帕霉素对番茄灰霉病菌菌丝形态的影响

Fig. 1 Mycelial morphological characterization of *B. cinerea* treated with rapamycin

在杀菌剂创制中得到应用, 雷帕霉素的高效抑菌活性及独特作用机制为新型杀菌剂开发提供了一种新途径。后续有必要针对雷帕霉素对植物病原真菌的详细作用机制深入展开探索, 以期获得新的农药作用靶标。

参考文献(Reference):

- [1] VÉZINA C, KUDELSKI A, SEHGAL S N. Rapamycin (AY-22, 989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle[J]. J Antibiot, 1975, 28(10): 721-726.
- [2] DUMDUMONT F J, MELINO M R, STARUCH M J, et al. The immunosuppressive macrolides FK-506 and rapamycin act as reciprocal antagonists in murine T cells[J]. J Immunol, 1990, 144(4): 1418-1424.
- [3] CALNE R Y, LIM S, SAMAAAN A, et al. Rapamycin for immunosuppression in organ allografting[J]. The Lancet, 1989, 334(8656): 227.
- [4] DOLINSKI K, SCHOLZ C, MUIR R S, et al. Functions of FKBP12 and mitochondrial cyclophilin active site residues *in vitro* and *in vivo* in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Mol Biol Cell, 1997, 8(11): 2267-2280.
- [5] HARRISON D E, STRONG R, SHARP Z D, et al. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice[J]. Nature, 2009, 460(7253): 392-395.
- [6] MELÉNDEZ H G, BILLON-GRAND G, FÈVRE M, et al. Role of the *Botrytis cinerea* FKBP12 ortholog in pathogenic development and in sulfur regulation[J]. Fungal Genet Biol, 2009, 46(4): 308-320.
- [7] TEICHERT S, WOTTAWA M, SCHÖNIG B, et al. Role of the *Fusarium fujikuroi* TOR kinase in nitrogen regulation and secondary metabolism[J]. Eukaryot Cell, 2006, 5(10): 1807-1819.
- [8] YU F W, GU Q, YUN Y Z, et al. The TOR signaling pathway regulates vegetative development and virulence in *Fusarium graminearum*[J]. New Phytol, 2014, 203(1): 219-232.
- [9] MU L Y. Methods of chemical plant protection[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1994: 142.
- [10] 金丽华, 陈长军, 王建新, 等. 噁菌酯及 SHAM 对 4 种植物病原真菌的活性和作用方式研究[J]. 中国农业科学, 2007, 40(10): 2206-2213.
- JIN L H, CHEN C J, WANG J X, et al. Activity of azoxystrobin and SHAM of four plant pathogens[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2007, 40(10): 2206-2213.
- [11] 徐从英, 侯毅平, 王建新, 等. 新型杀菌剂苯噁菌酯的抑菌活性及生物学特性[J]. 农药学报, 2014, 16(6): 667-672.
- XU C Y, HOU Y P, WANG J X, et al. Fungicidal activity and biological characteristics of benzothiofostrobin, a novel QoI fungicide[J]. Chin J Pestic Sci, 2014, 16(6): 667-672.
- [12] 张晓, 张艳军, 陈雨, 等. 噁菌酯对番茄早疫病菌的抑制作用[J]. 农药学报, 2008, 10(1): 41-46.
- ZHANG X, ZHANG Y J, CHEN Y, et al. Inhibitory effect of azoxystrobin on *Alternaria solani*[J]. Chin J Pestic Sci, 2008, 10(1): 41-46.
- [13] 张鹭, 侯玉霞, 袁会珠, 等. 复合物 III 抑制剂型杀菌剂——结构类型和作用机理[J]. 化学进展, 2010, 22(9): 1853-1868.
- ZHANG L, HOU Y X, YUAN H Z, et al. Structures and mechanism of action for complex III inhibiting-fungicides[J]. Progr Chem, 2010, 22(9): 1853-1868.
- [14] 朱书生, 卢晓红, 陈磊, 等. 羧酸酰胺类(CAAs)杀菌剂研究进展[J]. 农药学报, 2010, 12(1): 1-12.
- ZHU S S, LU X H, CHEN L, et al. Research advances in carboxylic acid amide fungicides[J]. Chin J Pestic Sci, 2010, 12(1): 1-12.
- [15] 李林, 关爱莹, 刘长令. 防治稻瘟病的新内吸性杀菌剂氟菌胺[J]. 农药, 2003, 42(7): 36-38.
- LI L, GUAN A Y, LIU C L. A new systemic fungicide for the control of rice blast: fenoxanil[J]. Pesticides, 2003, 42(7): 36-38.

(责任编辑: 唐静)