

· 植物保护 ·

DOI: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20250052



主持人: 缪卫国, 吴少英

Open Access



苯并烯氟菌唑抑制暹罗炭疽菌麦角甾醇生物合成机制初探

简沙沙^{1,2#}, 蒙亚玲^{1,2}, 邱煜荣^{1,2}, 王 萌^{1,2}, 张 宇^{1,2}, 杨 叶^{1,2}, 梁晓宇^{1,2*}

(1. 海南大学 三亚南繁研究院, 海南 三亚 572024 中国; 2. 海南大学 热带农林学院, 海南 儋州 571737 中国)

摘要: 酰胺类杀菌剂凭借多样的化学结构和广泛的靶点, 已成为农药研发的关键领域。然而, 不同酰胺类杀菌剂在同一病原菌上的毒力差异尚未充分阐明, 限制了其优化和应用。其中, 苯并烯氟菌唑作为一种新型琥珀酸脱氢酶抑制剂(succinate dehydrogenase inhibitor, SDHI), 表现出对炭疽菌的显著抑制效果, 尤其是通过显著破坏细胞膜完整性展现了不同于传统 SDHI 类杀菌剂的机制。本研究旨在进一步探讨苯并烯氟菌唑的分子机制, 揭示其对暹罗炭疽菌的多重抑制途径。通过转录组 KEGG 富集分析, 发现苯并烯氟菌唑显著抑制了暹罗炭疽菌 (*Colletotrichum siamense*) 的甾类化合物合成途径。荧光定量 PCR 进一步验证了麦角甾醇合成途径中 *ERG1*、*cyp51a* 等关键基因表达显著下降。气相色谱-串联质谱(GC-MS/MS)分析显示, 苯并烯氟菌唑处理后, 暹罗炭疽菌的角鲨烯和麦角甾醇含量显著降低, 羊毛甾醇含量增加。构建 *ERG1* 等 5 个麦角甾醇合成基因过表达菌株后, 发现 *ERG1* 过表达菌株对苯并烯氟菌唑的敏感性显著降低, 其他过表达菌株与野生型 CS23 菌株的药敏性一致。此外, 外源添加角鲨烯和麦角甾醇显著降低了苯并烯氟菌唑的抑菌效果, 尤其是在添加 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 麦角甾醇时, 苯并烯氟菌唑对 CS23 菌株的抑制率降至 25.18%, 对 *ERG1*-OE1 菌株则无抑制作用。综上所述, 苯并烯氟菌唑可能通过抑制 *ERG1* 基因的表达, 阻碍麦角甾醇的合成, 从而破坏暹罗炭疽菌的细胞膜, 最终抑制其菌丝生长。本研究初步揭示了苯并烯氟菌唑对炭疽菌的分子作用机制, 为新型酰胺类杀菌剂的研发提供了理论依据。

关键词: 暹罗炭疽菌; 苯并烯氟菌唑; 麦角甾醇合成; 分子机制

中图分类号: S482.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-7054(2025)05-0718-10

简沙沙, 蒙亚玲, 邱煜荣, 等. 苯并烯氟菌唑抑制暹罗炭疽菌麦角甾醇生物合成机制初探 [J]. 热带生物学报, 2025, 16(5): 718-727. doi: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20250052

炭疽菌是具有重要经济价值的植物病原体, 危害包括林木、蔬菜和花卉等多种植物。炭疽菌种类繁多, 遗传多态性丰富, 其中胶孢炭疽菌是最为常见的致病种之一。暹罗炭疽菌是胶孢炭疽菌复合群下的一个种, 是中国多种作物炭疽病的田间优势病原种^[1]。目前, 化学防治是控制该类病害最常用的方法, 常用药剂主要是由代森类杀菌剂、麦角甾醇生物合成抑制剂(DMI 类)、甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂(QoI 类)组成的单剂或混剂产品^[2-4]。

但长期单一药剂的使用导致抗性问题愈加突出, 寻找新途径防治炭疽病势在必行。

酰胺类杀菌剂是一类古老的杀菌剂, 已有近半个世纪的使用历史, 数量约占杀菌剂总数的四分之一, 且不断有新产品上市。酰胺类杀菌剂包含苯基酰胺、羧酸酰胺、吡啶酰胺和吡唑酰胺等多种类型的化合物, 其作用靶标涵盖了 RNA 聚合酶、纤维素合成酶、琥珀酸脱氢酶和麦角甾醇合成酶等关键催化酶, 是杀菌剂研发的焦点。2000 年后上市

收稿日期: 2025-03-26

修回日期: 2025-06-05

基金项目: 海南省“南海新星”科技创新人才平台项目(NHXXRCXM202310); “崖州湾”菁英人才科技专项项目(SCKJ-JYRC-2023-22); 国家自然科学基金地区基金项目(32160654)

*第一作者: 简沙沙(1998—), 女, 海南大学热带农林学院 2022 级硕士研究生。Email: shashajian666@163.com

*通信作者: 梁晓宇(1989—), 男, 副教授, 博士生导师, 主要研究方向: 热带作物病害防治。Email: liang2017@hainanu.edu.cn

的酰胺类杀菌剂结构新颖、活性高,已被广泛用于大田作物和经济作物病害的防治^[5]。其中,以吡唑酰胺类杀菌剂最多,主要包括苯并烯氟菌唑、吡唑菌胺、吡唑萘菌胺、联苯吡菌胺和氟唑菌酰胺等;其次是吡啶酰胺类杀菌剂,主要包括啉酰菌胺和氟吡菌酰胺等^[6]。这些酰胺类杀菌剂的作用机制是抑制病原菌的琥珀酸脱氢酶(succinate dehydrogenase, SDH),因此它们也被称为琥珀酸脱氢酶抑制剂(succinate dehydrogenase inhibitor, SDHI)^[7]。

SDHI类杀菌剂具有高效、广谱、选择性强等优势,兼具预防和治疗作用。对多种病原菌孢子萌发、芽管伸长、菌丝体生长等各阶段抑制作用显著。该类杀菌剂常用于谷物、蔬菜、果树等多种作物及草坪,防治由灰葡萄孢菌、镰刀菌、白粉菌、链格孢菌、丝核菌、尾孢菌等病原菌引起的病害^[8-9]。但大部分的SDHI类杀菌剂不能用于防治炭疽病,对炭疽菌属(*Colletotrichum*)的抑制效果很差^[10-11]。Ishii等^[12]首次研究发现SDHI类杀菌剂对炭疽菌抑菌活性差异较大,啉酰菌胺、氟唑菌酰胺和氟吡菌酰胺对炭疽菌无离体抑菌活性,活体防效较差。吡唑菌胺对于大多数炭疽菌离体抑菌活性较好,但活体防效一般。苯并烯氟菌唑由先正达公司于2003年开发,2012年上市,是一种广谱杀菌剂,具有优异的抑菌活性,在防治多种作物炭疽病方面表现出卓越效果^[12]。多数SDHI类杀菌剂对炭疽菌的 EC_{50} 值均大于 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,苯并烯氟菌唑对所有炭疽菌测试菌株的 EC_{50} 值不大于 $0.2\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;多数SDHI类杀菌剂无法抑制炭疽菌分生孢子的萌发和芽管伸长,苯并烯氟菌唑抑制孢子萌发的 EC_{50} 值均小于 $8.2\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $0.1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 即可显著抑制菌体分生孢子的芽管伸长^[13]。因此,除SDH酶靶标结合机制外^[14],苯并烯氟菌唑等SDHI类杀菌剂对炭疽菌毒力差异的产生可能还其他作用机制。本研究前期发现,苯并烯氟菌唑可以显著破坏暹罗炭疽菌的细胞膜,导致菌体电解质外泄^[15]。这种药剂的作用方式得到了其他研究数据的支持,如Hou等^[16]的透射电镜和细胞膜电导率实验结果表明,苯并烯氟菌唑可以破坏玉米小斑病菌的细胞膜。高杨杨^[17]研究发现,苯并烯氟菌唑具有优异的膜渗透性能,对胶孢炭疽菌和灰霉菌的膜渗透率均显著大于其他SDHI类杀菌剂,这可能是该药剂易破坏细胞膜从而顺利进

入菌体内部所致。麦角甾醇是真菌生物膜的特异性组分,对保持细胞膜完整性和流动性具有重要作用。麦角甾醇合成途径复杂,催化酶种类众多,合成中间产物多样,研究麦角甾醇合成通路有利于探明真菌麦角甾醇生物合成的分子调控机制,为改善现有杀菌剂的化学结构奠定理论基础。

本研究以橡胶树暹罗炭疽菌为研究对象,开展苯并烯氟菌唑处理下的转录调控分析,重点聚焦其对麦角甾醇合成通路的抑制作用;通过气相色谱-质谱联用(GC-MS/MS)分析,明确了苯并烯氟菌唑对麦角甾醇合成前体种类及其含量的影响;通过基因过表达技术验证了关键合成酶的功能,初步揭示了苯并烯氟菌唑抑制暹罗炭疽菌麦角甾醇合成的分子机制。该研究为炭疽病防治新药剂的筛选提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 菌株 橡胶树暹罗炭疽菌(*Colletotrichum siamense*)CS23菌株由本实验室分离鉴定并保存。

1.1.2 药剂 99.99%(m/m)苯并烯氟菌唑原药由德国Dr. Ehrenstorfer公司提供,丙酮溶解并配制成 $10000\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的储备液,于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。96.4%(m/m)麦角甾醇标准品和99.7%(m/m)角鲨烯标准品由坛墨质检科技股份有限公司提供。90%(m/m)羊毛甾醇、99%(m/m)胆固醇由上海源叶生物科技有限公司提供。

1.1.3 培养基 PDB培养基由马铃薯200g煮沸滤取的浸出液和葡萄糖20g组成;PDA培养基在PDB基础上加入琼脂粉20g以用于平板培养。YCS培养基包括上层、下层及液体培养基:上层培养基含酵母提取物1g、酸水解酪蛋白1g、葡萄糖10g和琼脂粉10g;下层培养基含酸水解酪蛋白1g、酵母提取物1g、蔗糖342g和琼脂粉12g;YCS液体培养基由蔗糖342g和酸水解酪蛋白1g组成;三者均定容至1000mL。所有培养基均在 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌20min后使用。

1.2 实验方法

1.2.1 麦角甾醇合成代谢产物甾醇中间体提取和检测

1.2.1.1 药剂处理与菌丝甾类化合物的提取 药剂处理:将CS23菌株于PDA平板上 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 活化培

养 3 d 后, 取直径 5 mm 的菌饼置于 100 mL PDB 液体培养基中, 以 28 °C 和 180 r·min⁻¹ 条件下摇床培养 36 h。根据前期研究, 选择 5 µg·mL⁻¹ 苯并烯氟菌唑作为处理质量浓度, 加入后继续培养 36 h^[15]。使用无菌水作为空白对照。滤干菌丝多余水分, 称取等量菌丝置真空冷冻干燥器干燥备用。

皂化法提取甾类化合物: 参考黄慧等^[18] 醇碱皂化法提取米曲霉麦角甾醇, 并在此基础上改进。称取 300 mg 冻干菌丝, 加入皂化剂氢氧化钾-甲醇溶液(60 g·L⁻¹), 在 70 °C 皂化 2 h。用 3 倍的正己烷萃取 3 次, 合并提取液, 旋转蒸发正己烷浓缩得到不可皂化脂质, 加入二氯甲烷使溶液体积为 1 mL, -20 °C 保存。

1.2.1.2 定性和定量分析方法 定性方法: 采用美国国家标准与技术研究院(National institute of standards and technology, NIST)谱库检索并结合甾醇类化合物的质谱裂解规律进行定性分析。

定量方法: 采用胆固醇内标法进行定量。将与麦角甾醇具有相似结构的外源物质胆固醇溶于二氯甲烷中, 配制成 12.5、25、50、100、200 µg·mL⁻¹ 的胆固醇标准液。然后, 将胆固醇标准液加入提取液中, 作为内标物质。通过 GC-MS/MS 对样品进行检测, 建立标准曲线为 $y=461.95x-7856.1$, $R^2=0.9916$, 最低检出限为 0.01 µg·mL⁻¹, 用于其他甾醇类化合物的定量分析。

1.2.1.3 GC-MS/MS 检测参数 色谱条件: TG-5ILMS 型气相色谱柱(30 m × 0.25 mm × 0.25 µm); 进样口温度 230 °C; 恒流模式; 不分流进样; 进样体积 1 µL。程序升温: 初始温度为 80 °C(保持 2 min), 以 30 °C/min 升至 250 °C(保持 5 min), 以 35 °C/min 升至 300 °C(保持 2 min)。载气为高纯氮气(99.999%)。

质谱条件: 电子轰击离子源(EI); 离子源温度 300 °C; 传输线温度 250 °C; 溶剂延迟时间 3 min; Full Scan 模式扫描, 质子数/电荷数(m/z)比值监测范围 50 ~ 500。

1.2.2 转录组分析 将活化好的 CS23 菌株挑取 5 个菌饼转入终浓度为 1 µg·mL⁻¹ 苯并烯氟菌唑 PDB 培养基中, 恒温摇床 28 °C、140 r·min⁻¹ 培养 3 d, 以无添加药剂为空白对照。用滤纸过滤菌丝并用无菌水清洗, 将吸干水分的菌丝体转移至研钵中加入液氮速冷, 并迅速研磨至粉末状, 取 500

mg 磨碎后的菌丝样品至 2.0 mL 无酶离心管中采用 Trizol 法提取 RNA, 方法参考天根总 RNA 提取试剂盒说明书。核酸浓度分析仪检测 RNA 合格后寄样送转录组测序。RNA-seq 数据已上传至 NCBI 数据库, 登录号为 PRJNA744009^[15]。使用倍数变化 ≥ 2 且 P 值 < 0.05 作为筛选标准, 以识别不同组别之间的差异表达基因。

1.2.3 基因过表达载体构建 采取同源重组的策略, 将目的基因 cDNA 序列引入 pCambia1303 过表达载体中。从 CS23 菌株中提取总 RNA, 经反转录合成 cDNA 文库, 以 cDNA 为模板使用表 1 中特异性引物分别 PCR 扩增 *ERG1*、*ERG7*、*cyp51a* 和 *cyp51b* 基因。采用 ClonExpress 无缝克隆技术, 将纯化得到的目的基因片段连入酶切线性 pCambia1303 载体质粒。连接体系为: 线性化载体 4.5 µL, 目的基因片段 0.5 µL, 2 × ClonExpress Mix 5 µL, ddH₂O 补足 10 µL PCR 仪 50 °C 反应 15 min。重组转化步骤参考 ClonExpress® Ultra One Step Cloning Kit 试剂盒说明书(诺唯赞)。菌落 PCR 扩增并测序以验证阳性单克隆, 阳性转化子加入甘油后置 -80 °C 保存。

1.2.4 荧光定量 PCR 验证基因表达 将 CS23 菌株和过表达菌株 *ERG1*-OE1、*ERG7*-OE1、*cyp51a*-OE1、*cyp51b*-OE1 在 PDA 平板上于 28 °C 活化培养 3 d 后取直径 5 mm 菌饼置于含有 100 mL PDB 液体培养基锥形瓶中 28 °C 和 180 r·min⁻¹ 下振荡培养。每个菌株设置 3 个生物学重复。药剂处理: 摇培 36 h 后向培养基中加入苯并烯氟菌唑使其终质量浓度为 5 µg·mL⁻¹, 继续摇培 36 h。滤干菌丝多余水分, 采用 Trizol 法提取 RNA 以 β -tubulin 基因为内参基因比较不同条件下的基因表达式, 使 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 方法计算每个基因的相对表达水平。基因表达量的相对标准偏差(RSD)均小于 15%, 数据以均值±SD 形式呈现。

1.2.5 暹罗炭疽菌基因过表达菌株对苯并烯氟菌唑敏感性测定 采用菌丝生长速率法测定菌株的药敏性^[19]。向灭菌后的 PDA 培养基中加入苯并烯氟菌唑储备液, 使其终质量浓度为 0.1 µg·mL⁻¹ 和 0.05 µg·mL⁻¹。将暹罗炭疽菌基因过表达菌株 *ERG1*-OE1、*ERG7*-OE1、*cyp51a*-OE1、*cyp51b*-OE1 在 PDA 平板上于 28 °C 活化培养 3 d 后, 从菌落边缘打取直径 5 mm 的菌饼, 分别接种于含不同质

表 1 本研究使用的引物

Tab. 1 Primer used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequences
<i>KL-CDS-cyp51b-F1</i>	ATGGGTCTCCTGCAGGAGGT
<i>KL-CDS-cyp51b-R1</i>	TTACGCCTCACGCTTCTCCC
<i>KL-CDS-cyp51a-F1</i>	ATGAGCCCTCTCGTTGTCTATGG
<i>KL-CDS-cyp51a-R1</i>	TCAATCACGTCGGGTCCACC
<i>KL-CDS-ERG1-F1</i>	ATGATTGAGAGTCCGACAGCAGC
<i>KL-CDS-ERG1-R1</i>	CTAGTTCAATTCGCGCCACAT
<i>KL-CDS-ERG7-F1</i>	ATGGTCGTCGAGAAGAAAGCG
<i>KL-CDS-ERG7-R1</i>	TTACTCCTTGCCGCTGATGC
<i>qp-cyp51a-F</i>	ACGTCGCAAGAACGGTGATA
<i>qp-cyp51a-R</i>	CTGACCTCCCATGAGAAGCG
<i>qp-cyp51b-F</i>	TGGAACAAGAAGCGCGATCA
<i>qp-cyp51b-R</i>	GTGCCGTTCTTGTAGGTGGA
<i>qp-ERG1-F</i>	GGCAAGACGAAGGACGACTA
<i>qp-ERG1-R</i>	GGAGGTACTCCTTGCGGAAC
<i>qp-ERG7-F</i>	TGCAAGGACTCGGACAAGTG
<i>qp-ERG7-R</i>	TGAGCGCCTCCGAAATACAG
<i>qp-β2-tubulin-F</i>	AGCCCTACAACGCCACTCTCT
<i>qp-β2-tubulin-R</i>	GTGGTTCAGGTCGCCGTAAG
<i>qp-ERG5-3F</i>	TCACGCCGAAC TACACTGTCC
<i>qp-ERG5-3R</i>	ACATATCTTCGCGCAAGGCAA
<i>qp-ERG5-2F</i>	AATTCGTCGTTCTTGCATCCG
<i>qp-ERG5-2R</i>	CTTCGATACTCTGCGTGGTCT
<i>qp-ERG6-2-F</i>	ATCAGACAGGCTCGTACAGCA
<i>qp-ERG6-2-R</i>	TGCCACCCTTGAGTCCCAT
<i>1303-F</i>	TTTGAACCTTTTCAGTTTCGAGCTTT
<i>1303-R</i>	CTGAATGCCACAGGCC
<i>cz-cyp51b-F</i>	agacatcaccatggtagatct ATGGGTCTCCTGCAGGAGGT
<i>cz-cyp51b-R</i>	tctacaggacgtaaaactagt TTACGCCTCACGCTTCTCCC
<i>cz-cyp51a-F</i>	agacatcaccatggtagatct ATGAGCCCTCTCGTTGTCTATGG
<i>cz-cyp51a-R</i>	tctacaggacgtaaaactagt TCAATCACGTCGGGTCCACC
<i>cz-ERG1-F</i>	agacatcaccatggtagatct ATGATTGAGAGTCCGACAGCAGC
<i>cz-ERG1-R</i>	tctacaggacgtaaaactagt CTAGTTCAATTCGCGCCACAT
<i>cz-ERG7-F</i>	agacatcaccatggtagatct ATGGTCGTCGAGAAGAAAGCG
<i>cz-ERG7-R</i>	tctacaggacgtaaaactagt TTACTCCTTGCCGCTGATGC

注: 小写字母代表线性化载体重叠序列。

Note: The lowercase letters represent an overlapping sequence of linearized vector.

量浓度苯并烯氟菌唑的 PDA 平板中央, 每质量浓度设 3 个重复, 于 28 ℃ 培养 5 d 后, 采用交叉法测量各处理的菌落直径, 计算菌丝生长抑制率并使用 SPSS 22.0 进行统计分析, 确保结果可靠性。每个处理 3 次重复。

1.2.6 外源添加麦角甾醇和角鲨烯对暹罗炭疽菌菌株生长的影响 方法参考 Cao 等^[20] 稍作修改, PDA 培养基中加入苯并烯氟菌唑储备液, 使其终质量浓度为 0.1 μg·mL⁻¹。同时, 加入适量麦角甾醇和角鲨烯母液形成不同浓度的药剂外源物质组合。将 CS23 菌株及过表达菌株分别接种于 PDA 平板正中央 28 ℃ 培养 5 d 后, 采用交叉法测量各处理的菌落直径, 同 1.2.5 计算不同外源组物质对过表达菌株的菌丝生长抑制率。每个处理 3 次重复。

2 结果与分析

2.1 苯并烯氟菌唑对暹罗炭疽菌细胞膜相关基因的转录组分析 为了探究苯并烯氟菌唑对破坏暹罗炭疽菌的细胞膜完整性的分子作用机制, 本研究对苯并烯氟菌唑处理条件下的 CS23 菌株进行转录组分析。以药剂未处理的 CS23 菌株转录组为对照, 使用倍数变化 ≥ 2 且 *P* 值 < 0.05 为显著差异分析 GO 途径和 KEGG 富集通路(表 2), 发现在苯并烯氟菌唑处理组的差异基因显著富集在细胞膜相关途径(0031224; 0044425; 0016020)和甾类化合物合成通路(ko00100)中。尤其是在麦角甾醇合成通路中, 有 6 个关键基因表达显著下调, 相对表达量在 0.11 ~ 0.43 之间。另外, 通过荧光定量 PCR 技术分析了这些基因的表达量, 发现表达趋势与转录组数据一致, 相对表达量在 0.16 ~ 0.48 之间(表 3)。上述结果表明, 苯并烯氟菌唑可能通过抑制麦角甾醇的生物合成来破坏暹罗炭疽菌的细胞膜完整性。

2.2 苯并烯氟菌唑对麦角甾醇生物合成途径中间体的影响 为了进一步明确苯并烯氟菌唑对麦角甾醇生物合成通路的作用机制, 本研究利用 GC-MS/MS 技术分析了暹罗炭疽菌的麦角甾醇生物合成途径中的中间体组成, 根据甾醇类化合物的代谢规律及 NIST 质谱库检索分析, 鉴定出 10 种甾醇类化合物, 按照麦角甾醇合成路线顺序依次是角鲨烯、羊毛甾醇、4,4-二甲基胆甾-8, 14,24-三烯

表 2 苯并烯氟菌唑处理条件下的 CS23 菌株转录组 GO 和 KEGG 分析

Tab. 2 GO and KEGG analysis of differential genes of CS23 treated with benzovindiflupyr

ID	描述 Description	q 值 q-value
GO terms		
GO:0031224	膜内在成分 intrinsic component of membrane	0.000 089
GO:0044425	膜部分 membrane part	0.009 700
GO:0016020	膜 Membrane	0.010 000
GO:0071944	胞外 cell periphery	0.049 000
GO:0036387	Pre-RC 复合体 pre-replicative complex	0.049 000
GO:0003824	催化活性 catalytic activity	0.013 000
KEGG pathway		
ko00100	甾类化合物合成 steroid biosynthesis	0.000 560
ko00360	苯丙氨酸代谢 phenylalanine metabolism	0.001 100
ko01110	次级生物合成代谢 biosynthesis of secondary metabolites	0.002 200
ko00380	色氨酸代谢 tryptophan metabolism	0.002 200
ko00500	淀粉和蔗糖代谢 starch and sucrose metabolism	0.004 000
ko00040	戊糖和葡萄糖醛酸酯途径 pentose and glucuronate interconversions	0.022 000
ko02010	ABC 转运 ABC transporters	0.022 000
ko00052	半乳糖代谢 galactose metabolism	0.045 000

注: q 值小于 0.05 代表显著富集。

Note: The q-value < 0.05 indicates significant enrichment.

醇、4,4-二甲基酵母甾醇、酵母甾醇、4 α -甲基酵母甾醇-4-羧酸酯、粪甾醇、表甾醇、麦角甾烯醇、麦角甾醇(表 4)。以未处理组为对照,本研究分析了苯并烯氟菌唑对暹罗炭疽菌中 10 种甾醇类化合物质量浓度的影响。定量结果显示,在 2 组处理的菌丝中均检测到 10 种甾醇类化合物,其中角鲨烯、羊毛甾醇、4 α -甲基酵母甾醇-4-羧酸酯和麦角甾醇的质量浓度在 2 组之间存在显著差异。苯并烯氟菌唑处理后,4 α -甲基酵母甾醇-4-羧酸酯和麦角甾醇的质量浓度显著降低,而羊毛甾醇的质量

表 3 苯并烯氟菌唑处理条件下的 CS23 菌株麦角甾醇生物合成基因相对表达量

Tab. 3 Relative expression of ergosterol biosynthesis gene in CS23 strain treated with benzovindiflupyr

基因ID Gene ID	基因名称 Gene name	转录组结果 Transcriptome result	荧光定量PCR结果 qRT-PCR result
ncbi_59275084	<i>ERG5</i>	0.11	0.22 $\pm$ 0.11
ncbi_59276216	<i>cyp51a</i>	0.17	0.17 $\pm$ 0.06
ncbi_59275085	<i>ERG5</i>	0.18	0.16 $\pm$ 0.06
ncbi_59266665	<i>ERG6</i>	0.22	0.19 $\pm$ 0.03
ncbi_59271246	<i>ERG1</i>	0.43	0.48 $\pm$ 0.02
ncbi_59267068	<i>cyp51b</i>	0.36	0.36 $\pm$ 0.02

浓度则显著升高(图 1)。结果表明,苯并烯氟菌唑可影响暹罗炭疽菌体内麦角甾醇生物合成中间体的质量浓度,最终影响麦角甾醇的生物合成

2.3 麦角甾醇合成相关基因过表达菌株的构建及

药敏性 参考真菌麦角甾醇合成途径^[21],结合苯并烯氟菌唑对麦角甾醇合成中间体及编码基因的抑制作用,筛选出可能受药剂作用的 4 个催化酶基因,分别为 *ERG1*、*ERG7*、*cyp51a* 和 *cyp51b*。本研究成功构建了这 4 个基因的暹罗炭疽菌过表达菌株,并与野生型菌株 CS23 进行了荧光定量分析。结果表明,过表达菌株的基因相对表达量均显著高于 CS23 菌株,表达水平提高了 1.7~3.1 倍(图 2-A)。此外,进一步测定了这些过表达菌株对苯并烯氟菌唑的药敏性。结果显示,与 CS23 菌株相比,*ERG1* 基因的过表达菌株 *ERG1*-OE1 对苯并烯氟菌唑的敏感性降低了 7.6%~8.9%,而其他过表达菌株与 CS23 菌株无显著差异(图 2-B)。这表明,苯并烯氟菌唑可能通过抑制 CS23 菌株中 *ERG1* 基因的表达,从而影响麦角甾醇的生物合成。

2.4 外源添加角鲨烯和麦角甾醇对苯并烯氟菌唑

抑菌效果的影响 以未添加组为对照,研究外源添加角鲨烯和麦角甾醇条件下,苯并烯氟菌唑对 CS23 菌株及 *ERG1*-OE1 菌株菌丝生长抑制率的影响。结果表明,0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 苯并烯氟菌唑处理后 2~5 d 内,菌丝生长抑制率逐渐降低,外源添加不同质量浓度角鲨烯和麦角甾醇显著降低了药剂对 2 个菌株的抑制率,尤其在第 5 天时,100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 麦角甾醇处理下,苯并烯氟菌唑对 CS23 菌株的抑

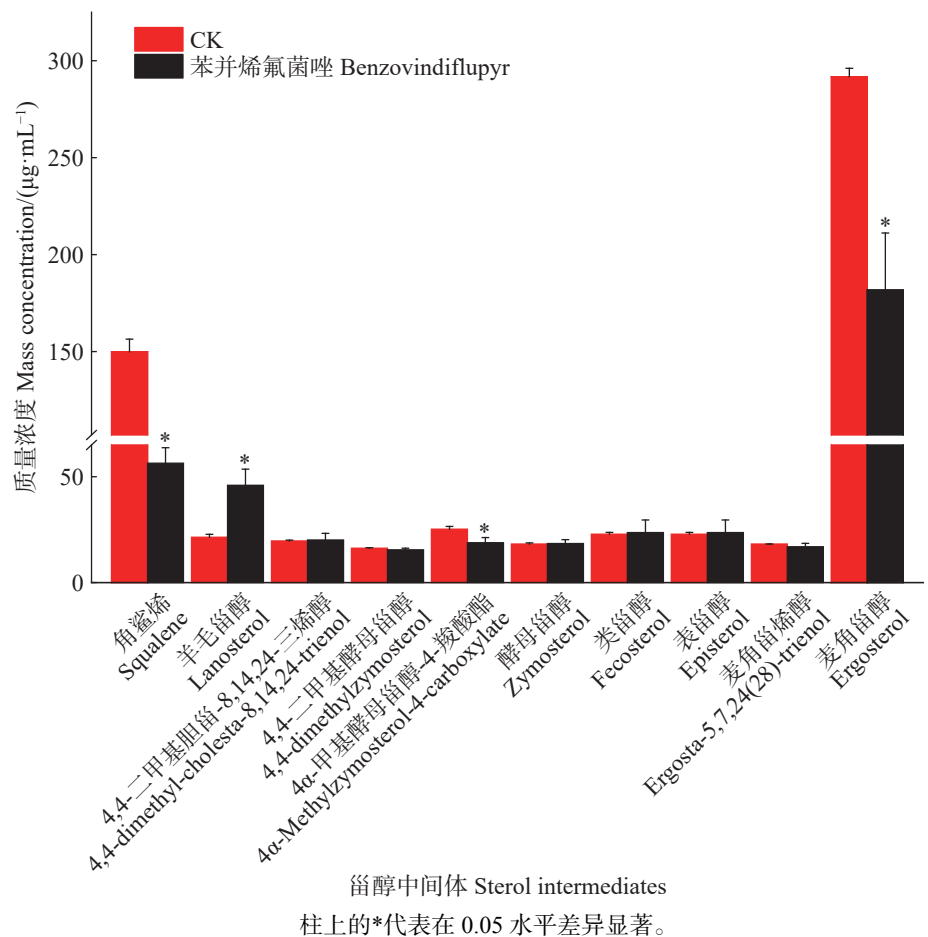
表 4 CS23 菌株的 10 种甾醇类化合物 GC-MS/MS 鉴定结果

Tab. 4 Identification results of 10 sterol compounds by GC-MS/MS

序号 No.	中文名称 Chinese name	英文名称 English name	保留时间/min Retention time/min	相对分子质量 Molecular weight	分子式 Molecular formula
1	角鲨烯	Squalene	17.04	410.7180	C ₃₀ H ₅₀
2	羊毛甾醇	Lanosterol	24.23	426.7174	C ₃₀ H ₅₀ O
3	4,4-二甲基胆甾-8,14,24-三烯醇	4,4-dimethyl-cholesta-8,14,24-trienol	25.21	410.6749	C ₂₉ H ₄₆ O
4	4,4-二甲基酵母甾醇	4,4-dimethylzymosterol	22.74	412.6908	C ₂₉ H ₄₈ O
5	4α-甲基酵母甾醇-4-羧酸酯	4α-Methylzymosterol-4-carboxylate	24.95	442.6737	C ₂₉ H ₄₆ O ₃
6	酵母甾醇	Zymosterol	23.72	384.6377	C ₂₇ H ₄₄ O
7	粪甾醇	Fecosterol	23.20	398.6642	C ₂₈ H ₄₆ O
8	表甾醇	Episterol	23.40	398.6642	C ₂₈ H ₄₆ O
9	麦角甾烯醇	Ergosta-5,7,24(28)-trienol	21.99	396.6484	C ₂₈ H ₄₄ O
10	麦角甾醇	Ergosterol	22.60	396.6484	C ₂₈ H ₄₄ O

注: 甾醇类化合物的排序依据麦角甾醇生物合成通路的先后顺序, 从1至10依次排列。

Note: The sterol compounds are listed in the order of the ergosterol biosynthesis pathway, from 1 to 10.

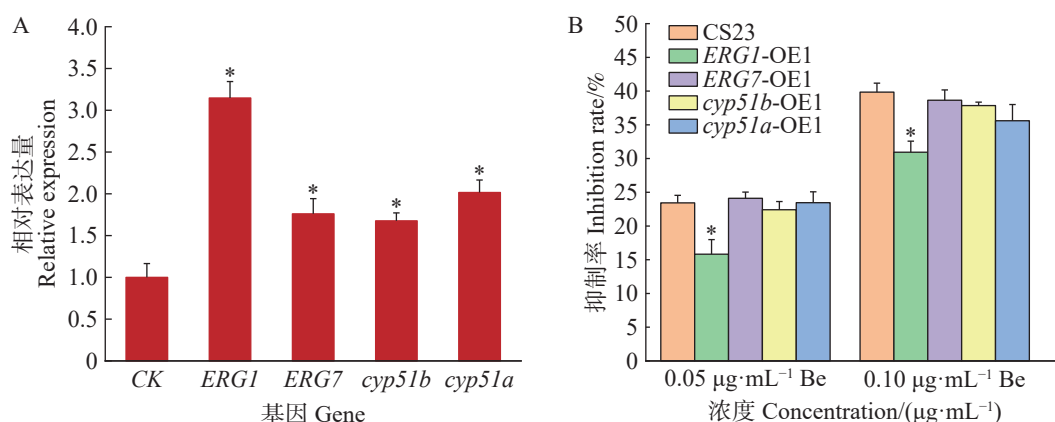


柱上的*代表在 0.05 水平差异显著。

An asterisk on the bars indicates a significant difference at the 0.05 level.

图 1 苯并烯氟菌唑处理后菌株体内 10 种甾醇中间体的质量浓度

Fig. 1 The content of 10 sterol intermediates in the strain after treatment with benzovindiflupyr



柱上的*代表在 0.05 水平差异显著。

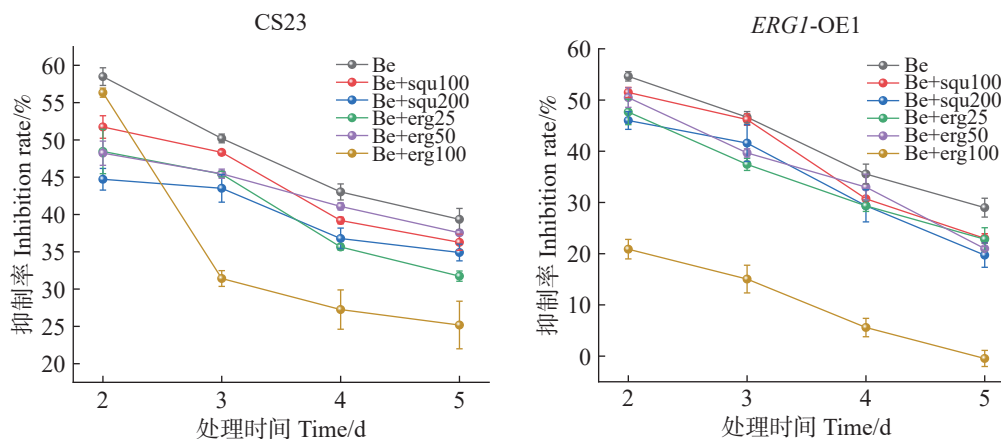
An asterisk on the bars indicates a significant difference at the 0.05 level.

图 2 过表达菌株的基因相对表达量(A)和对苯并烯氟菌唑的药敏性(B)

Fig. 2 The relative gene expression of the overexpression strains(A) and their sensitivity to benzovindiflupyr(B)

制率仅为 25.18%, 对 *ERG1*-OE1 则无抑制效果 (图 3)。由此可见, 外源添加角鲨烯和麦角甾醇能

显著降低苯并烯氟菌唑对暹罗炭疽菌的生长抑制作用。



Be 代表 $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 苯并烯氟菌唑, squ100、200 分别代表 100 、 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 角鲨烯, erg25、50、100 分别代表 25 、 50 、 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 麦角甾醇。

Be represents $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of benzovindiflupyr, squ100 and squ200 represent $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of squalene, respectively, while erg25, erg50, and erg100 represent $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, and $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of ergosterol, respectively.

图 3 外源添加角鲨烯和麦角甾醇条件下苯并烯氟菌唑的抑菌效果

Fig. 3 The inhibitory effect of benzovindiflupyr under the conditions of exogenous addition of squalene and ergosterol

3 结论与讨论

酰胺类杀菌剂苯并烯氟菌唑在防治多种作物炭疽病方面展现出独特优势, 能够有效抑制炭疽菌的菌丝生长、孢子萌发和芽管伸长^[11-13]。因此, Ishii 等^[12]人提出, 除了 SDH 酶靶标结合机制外, 可能还存在其他作用机制, 导致苯并烯氟菌唑等 SDHI 类杀菌剂对炭疽菌的毒力差异。然而, 该现象背后的具体作用机制尚未完全阐明。本研究对苯并烯氟菌唑处理下的暹罗炭疽菌进行转录组分析, 发现差异基因显著富集细胞膜相关途径和甾类化合物合成通路。尤其是在麦角甾醇合成通路中, 有 6 个关键基因表达差异显著, 相对表达量在

0.11 ~ 0.43。经荧光定量 PCR 技术验证, 这些基因表达趋势与转录组数据一致。

麦角甾醇又称麦角固醇, 是一种类异戊二烯的准平面分子, 是真菌细胞膜上特有的甾醇类组分。麦角甾醇是真菌细胞膜的关键成分, 参与质膜融合、胞间运输等多种生物过程^[22-24]。此外, 麦角甾醇还存在于线粒体、液泡、内质网等多种内膜结构中, 对胞内信号传递、物质运输、遗传等生物学过程意义重大^[25-27]。本研究建立了 GC-MS/MS 技术, 用于分析麦角甾醇生物合成途径中的甾醇组分及其含量, 并推测苯并烯氟菌唑可能作用的关键合成酶。在真菌甾醇组分的分析中, 尽管已

有多项研究采用 GC-MS 进行定性和定量分析并取得了良好效果, 但该方法仍需进行衍生化处理^[28-30]。本研究中提取的不可皂化脂质无须衍生化处理, 可直接通过 GC-MS/MS 进行分离, 获得更精确的母离子分子量, 对甾醇组分进行定性和定量分析。在检测的 10 种甾醇组分中, 角鲨烯、羊毛甾醇、4 α -甲基酵母甾醇-4-羧酸酯和麦角甾醇的含量在不同处理间显著变化。结果表明, 苯并烯氟菌唑显著作用于暹罗炭疽菌的麦角甾醇生物合成通路, 这与转录组分析及 GO 和 KEGG 富集分析的结果一致。

多项研究表明, 阻断或破坏麦角甾醇合成途径中的任意一步, 都会导致中间代谢产物增加或最终麦角甾醇合成量减少^[31-33]。苯并烯氟菌唑可能抑制炭疽菌中的角鲨烯环氧化酶, 且其作用靶标有别于麦角甾醇类杀菌剂^[34-35]。为进一步验证角鲨烯环氧化酶的作用, 本研究通过基因过表达技术构建了过表达菌株。结果显示, 与 CS23 菌株相比, 编码角鲨烯环氧化酶的 *ERG1* 基因过表达菌株 *ERG1-OE1* 对苯并烯氟菌唑的敏感性显著降低, 说明苯并烯氟菌唑可能会抑制角鲨烯环氧化酶的活性。此外, 外源添加角鲨烯和麦角甾醇后, 暹罗炭疽菌对苯并烯氟菌唑的药敏性显著降低, 表明外源角鲨烯和麦角甾醇的添加增加了菌体内麦角甾醇的含量, 可能通过减弱药剂对细胞膜完整性的破坏作用, 降低了其抑制效果^[36]。

综上所述, 苯并烯氟菌唑不仅通过靶向 SDH 酶发挥作用, 还能够抑制麦角甾醇合成酶相关基因的表达, 从而阻断麦角甾醇合成途径, 展现出多重作用机制。其中, *ERG1* 基因的显著变化与中间代谢产物的积累及药敏性的改变密切相关, 可能是苯并烯氟菌唑的关键作用靶标之一。本项研究的意义在于初步揭示了苯并烯氟菌唑抑制暹罗炭疽菌的分子机制, 为炭疽病防治新药剂的筛选与应用提供了重要的理论依据。然而, 本研究虽然利用基因过表达技术验证了关键合成酶的功能, 但仍存在一定的实验局限性, 尤其是药剂与靶标酶的直接结合尚需进一步实验证据。为克服上述局限, 后续研究将通过酶活性测定、分子对接和基因敲除等实验方法, 进一步验证和完善本研究的预测结果。这将有助于进一步揭示苯并烯氟菌唑抑制暹罗炭疽菌麦角甾醇合成的分子机制, 为新

型酰胺类杀菌剂的研发提供理论依据。

参考文献:

- [1] 刘欢庆, 周双针, 高菁, 等. 暹罗炭疽菌同源异型盒转录因子 CsHtf1 的生物学功能[J]. *微生物学通报*, 2023, 50(12): 5350-5362.
- [2] 芦志成, 张鹏飞, 李慧超, 等. 中国农药创制概述与展望[J]. *农药学报*, 2019, 21(5/6): 551-579.
- [3] 路粉, 王文桥. 我国蔬菜杀菌剂及其应用状况[J]. *中国蔬菜*, 2017(10): 6-13.
- [4] 马云云, 吴灿, 王兰芬, 等. 滇黄精炭疽病菌的初步鉴定及其对 3 种杀菌剂的敏感性[J]. *农药学报*, 2020, 22(5): 742-751.
- [5] 毛玉帅, 段亚冰, 周明国. 琥珀酸脱氢酶抑制剂类杀菌剂抗性研究进展[J]. *农药学报*, 2022, 24(5): 937-948.
- [6] 魏阁, 高梦琪, 朱晓磊, 等. 靶向琥珀酸脱氢酶的酰胺类杀菌剂的研究进展[J]. *农药学报*, 2019, 21(5/6): 673-680.
- [7] WANG Q, MAO Y S, LI S X, et al. Molecular mechanism of *Sclerotinia sclerotiorum* resistance to succinate dehydrogenase inhibitor fungicides[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(23): 7039-7048.
- [8] 仇是胜, 柏亚罗. 琥珀酸脱氢酶抑制剂类杀菌剂的研发进展 (I)[J]. *现代农药*, 2014, 13(6): 1-7.
- [9] 柏亚罗. 琥珀酸脱氢酶抑制剂 (SDHI) 类杀菌剂研发进展及其重点产品评析[J]. *世界农药*, 2022, 44(12): 6-25.
- [10] REBELLO C S, BAGGIO J S, FORCELINI B B, et al. Sensitivity of *Colletotrichum acutatum* species complex from strawberry to fungicide alternatives to quinone-outside inhibitors[J]. *Plant Disease*, 2022, 106(8): 2053-2059.
- [11] OLIVEIRA M S, CORDOVA L G, PERES N A. Efficacy and baseline sensitivity of succinate-dehydrogenase-inhibitor fungicides for management of *Colletotrichum* crown rot of strawberry[J]. *Plant Disease*, 2020, 104(11): 2860-2865.
- [12] ISHII H, ZHEN F, HU M J, et al. Efficacy of SDHI fungicides, including benzovindiflupyr, against *Colletotrichum* species[J]. *Pest Management Science*, 2016, 72(10): 1844-1853.
- [13] ISHII H, WATANABE H, YAMAOKA Y, et al. Sensitivity to fungicides in isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. acutatum* species complexes and efficacy against anthracnose diseases[J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2022, 182: 105049.
- [14] FRAAIJE B A, BAYON C, ATKINS S, et al. Risk assessment studies on succinate dehydrogenase inhibitors, the new weapons in the battle to control Septoria leaf blotch in wheat[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2012, 13(3): 263-275.
- [15] LIANG X Y, ZOU L J, LIAN W X, et al. Comparative

- transcriptome analyses reveal conserved and distinct mechanisms of the SDHI fungicide benzovindiflupyr inhibiting *Colletotrichum*[J]. *Phytopathology*[®], 2022, 112(6): 1255 – 1263.
- [16] HOU Y P, CHEN Y L, WU L Y, et al. Baseline sensitivity of *Bipolaris maydis* to the novel succinate dehydrogenase inhibitor benzovindiflupyr and its efficacy[J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2018, 149: 81 – 88.
- [17] 高杨杨. 琥珀酸脱氢酶抑制剂类杀菌剂对炭疽病菌的毒力差异机制[D]. 泰安: 山东农业大学, 2021. doi: 10.27277/d.cnki.gsdnu.2021.000053
- [18] 黄慧, 王立, 胡志宏, 等. 培养基组分及培养条件对米曲霉麦角甾醇含量的影响[J]. *江西科技师范大学学报*, 2021(6): 87 – 92.
- [19] 陈雨, 张文芝, 周明国. 氰烯菌酯对禾谷镰孢菌分生孢子萌发及菌丝生长的影响[J]. *农药学学报*, 2007, 9(3): 235 – 239.
- [20] CAO Y X, SONG X N, XU G Y, et al. Study on the antifungal activity and potential mechanism of Natamycin against *Colletotrichum fructicola*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(46): 17713 – 17722.
- [21] JORDÁ T, PUIG S. Regulation of ergosterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Genes*, 2020, 11(7): 795.
- [22] UMEBAYASHI K, NAKANO A. Ergosterol is required for targeting of tryptophan permease to the yeast plasma membrane[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2003, 161(6): 1117 – 1131.
- [23] MOURITSEN O G, JØRGENSEN K. Small-scale lipid-membrane structure: simulation versus experiment[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 1997, 7(4): 518 – 527.
- [24] HEESE-PECK A, PICHLER H, ZANOLARI B, et al. Multiple functions of sterols in yeast endocytosis[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2002, 13(8): 2664 – 2680.
- [25] SCHNEITER R, BRÜGGER B, SANDHOFF R, et al. Electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) analysis of the lipid molecular species composition of yeast subcellular membranes reveals acyl chain-based sorting/remodeling of distinct molecular species En route to the plasma membrane[J]. *The Journal of Cell Biology*, 1999, 146(4): 741 – 754.
- [26] NÜRNBERGER T, BRUNNER F, KEMMERLING B, et al. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences[J]. *Immunological Reviews*, 2004, 198(1): 249 – 266.
- [27] LAQUITAINE L, GOMÈS E, FRANÇOIS J, et al. Molecular basis of ergosterol-induced protection of grape against *Botrytis cinerea*: induction of type I LTP promoter activity, WRKY, and stilbene synthase gene expression[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*[®], 2006, 19(10): 1103 – 1112.
- [28] 刘洪涛, 高平挥, 曹永兵, 等. 气-质联用研究氟康唑对白念珠菌甾醇生物合成的抑制作用[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2002, 16(5): 368 – 371.
- [29] 王添琦, 李祥, 李玲, 等. 气质联用法定量分析白念珠菌中甾醇含量[J]. *药学实践杂志*, 2013, 31(4): 277 – 279.
- [30] OUYANG Q L, TAO N G, JING G X. Transcriptional profiling analysis of *Penicillium digitatum*, the causal agent of citrus green mold, unravels an inhibited ergosterol biosynthesis pathway in response to citral[J]. *BMC Genomics*, 2016, 17(1): 599.
- [31] 刘雪, 关丽杰. 苯丙烯菌酮对水稻稻瘟病原真菌细胞壁膜的作用[J]. *江苏农业科学*, 2019, 47(22): 117 – 121.
- [32] HU Z H, HE B, MA L, et al. Recent advances in ergosterol biosynthesis and regulation mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Indian Journal of Microbiology*, 2017, 57(3): 270 – 277.
- [33] HAYAKAWA H, SOBUE F, MOTOYAMA K, et al. Identification of enzymes involved in the mevalonate pathway of *Flavobacterium johnsoniae*[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2017, 487(3): 702 – 708.
- [34] 刘凤华, 马迪成, 张晓敏, 等. 植物病原真菌对甾醇脱甲基抑制剂类杀菌剂抗性分子机制研究进展[J]. *农药学报*, 2022, 24(3): 452 – 464.
- [35] HOFFMEISTER M, ZITO R, BÖHM J, et al. Mutations in *Cyp51* of *Venturia inaequalis* and their effects on DMI sensitivity[J]. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 2021, 128(6): 1467 – 1478.
- [36] TURK M, PLEMENITAŠ A, GUNDE-CIMERMAN N. Extremophilic yeasts: plasma-membrane fluidity as determinant of stress tolerance[J]. *Fungal Biology*, 2011, 115(10): 950 – 958.

Molecular mechanism of benzovindiflupyr inhibiting ergosterol biosynthesis in *Colletotrichum siamense*

JIAN Shasha^{1,2#}, MENG Yaling^{1,2}, QIU Yurong^{1,2}, WANG Meng^{1,2},
ZHANG Yu^{1,2}, YANG Ye^{1,2}, LIANG Xiaoyu^{1,2*}

(1. Sanya Institute of Breeding and Multiplication, Hainan University, Sanya, Hainan 572024, China; 2. College of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Danzhou, Hainan 571737, China)

Abstract: Amidine fungicides, with their diverse chemical structures and broad targets, have become a key area in pesticide development. However, the differences in toxicity among various amidine fungicides against the same pathogen have not been fully elucidated, limiting their optimization and widespread application. Among them, benzovindiflupyr, as a novel succinate dehydrogenase inhibitor (SDHI), showed significant inhibitory effects against *Colletotrichum spp*, especially by significantly disrupting the cell membrane integrity demonstrating a mechanism different from that of traditional SDHI fungicides. The aim of the present study was to further investigate the molecular mechanism of benzovindiflupyr and to reveal its multiple inhibitory pathways against *C. siamense*. The transcriptome KEGG enrichment analysis revealed that benzovindiflupyr, significantly inhibited the steroid synthesis pathway in *C. siamense*. Fluorescence quantitative PCR further verified that the expression of key genes in the ergosterol synthesis pathway, such as *ERG1* and *cyp51a*, was significantly decreased. Gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) analysis showed that squalene and ergosterol contents of *C. siamense* were significantly decreased and lanosterol content was increased by benzovindiflupyr treatment. After constructing five ergosterol synthesis gene overexpression strains, including *ERG1*, it was found that *ERG1* overexpression strains were significantly less susceptible to benzovindiflupyr, and the other overexpression strains were consistent with the drug sensitivity of wild-type CS23 strain. In addition, exogenous addition of squalene and ergosterol significantly reduced the inhibitory effect of benzoflumizole, especially at the addition of 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ergosterol, the inhibitory effect of benzovindiflupyr was reduced to 25.18% against CS23 strain, while no inhibitory effect was observed against *ERG1*-OE1 strain. In summary, benzovindiflupyr may inhibit ergosterol synthesis by suppressing the expression of the *ERG1* gene, thereby disrupting the cell membrane of *C. siamense*, and ultimately inhibiting mycelial growth. This study provides preliminary insights into the molecular mechanism of benzovindiflupyr against anthracnose fungi and offers theoretical support for the development of novel amide fungicides.

Keywords: *Colletotrichum siamense*; Benzovindiflupyr; Ergosterol synthesis; Molecular mechanism

(责任编辑: 邹游兴)