

咯菌腈羧酸衍生物内吸传导性及对香蕉枯萎病的防效测定



吴瀚翔¹ 陈志彬¹ 肖春霞¹ 赖 多² 姚光凯^{1*} 徐汉虹^{1*}

(1. 华南农业大学, 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 天然农药与化学生物学教育部重点实验室, 广州 510642; 2. 广东省农业科学院果树研究所, 广东省热带亚热带果树研究重点实验室, 农业农村部南亚热带果树生物学与遗传资源利用重点实验室, 广州 510640)

摘要: 为研发用于防治香蕉枯萎病的维管组织导向杀菌剂, 基于植物韧皮部“离子井”效应对非内吸杀菌剂咯菌腈进行弱酸化结构修饰, 在蓖麻模型上完成韧皮部输导性筛选和机制验证, 通过盆栽试验研究咯菌腈羧酸衍生物在香蕉植株上的输导分布, 并测定衍生物对香蕉枯萎病的防效。结果表明: 羧酸基团引入使咯菌腈衍生物在蓖麻幼苗上表现出韧皮部输导性, 证明存在pH依赖的“离子井”效应机制; 盆栽试验结果显示, 衍生物1a在被叶片吸收后能向下传递到香蕉植株球茎和根部, 并能够降解释放出咯菌腈, 对香蕉枯萎病的防效为54.5%, 显著高于咯菌腈原药处理组的防效6.5%。表明基于韧皮部“离子井”效应的结构修饰是香蕉维管组织导向杀菌剂研发的有效途径。

关键词: 化学防治; 尖孢镰刀菌; 导向农药; 韧皮部; 输导性

Systemicity of fludioxonil derivatives with a carboxylic acid function and their control effect against *Fusarium* wilt of banana

Wu Hanxiang¹ Chen Zhibin¹ Xiao Chunxia¹ Lai Duo² Yao Guangkai^{1*} Xu Hanhong^{1*}

(1. State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-Bioresources; Key Laboratory of Natural Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education; South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong Province, China; 2. Key Laboratory of South Subtropical Fruit Biology and Genetic Resource Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Guangdong Provincial Key Laboratory of Tropical and Subtropical Fruit Tree Research, Institute of Fruit Tree Research, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, Guangdong Province, China)

Abstract: In order to develop vascular-guided fungicides against *Fusarium* wilt of banana, non-systemic fungicide fludioxonil was modified by adding a carboxylic acid group based on ion-trap mechanism of plant phloem. The phloem mobility and loading mechanisms of the obtained acidic derivatives were studied on the castor bean model. Pot experiments were performed to evaluate the long-distance translocation of the selected derivative and its efficacy against banana *Fusarium* wilt. The results showed that the introduction of carboxylic acid group conferred phloem mobility to non-systemic fludioxonil in castor bean seedlings, and the pH-dependent ion-trap mechanism was involved in the phloem loading process. In pot experiments, acidic derivative 1a could be translocated to the rhizomes and roots of banana plants after foliar application, and fludioxonil was observed to be released in rhizomes and roots of 1a-treated banana plants. The efficacy of derivative 1a against banana *Fusarium* wilt *in vivo* was 54.5%, which was significantly higher than that of fludioxonil (6.5%). The results suggested that chemical

基金项目: 国家自然科学基金(31801777), 中国博士后基金(2018M643104, 2018M643105), 广东省热带亚热带果树研究重点实验室开放课题

* 通信作者 (Authors for correspondence), E-mail: gkyao@scau.edu.cn, hhxu@scau.edu.cn

收稿日期: 2021-01-07

modification according to the ion-trap mechanism was a feasible approach to developing banana vascular-guided fungicides.

Key words: chemical control; *Fusarium oxysporum*; guided pesticide; phloem; translocation

香蕉是世界上最重要的水果之一,年产量超过1亿t,全球有超过4亿人将香蕉作为主食(Dita et al., 2018; Bubici et al., 2019)。近百年来,全球的香蕉产业受到了枯萎病的严重威胁(Ploetz, 2015; Stokstad, 2019)。我国作为世界上香蕉主产国,枯萎病在我国所有香蕉主产区均有报道,给我国香蕉产业带来了毁灭性打击,严重制约我国香蕉产业发展(周登博等, 2016; 李华平等, 2019)。香蕉枯萎病是由尖孢镰刀菌古巴专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, Foc)引起的一种土传维管束病害,病原菌侵入香蕉根系木质部,随后在香蕉维管组织木质部和韧皮部中大量繁殖(Li et al., 2011; Guo et al., 2015; Li et al., 2017)。香蕉维管组织功能被病原菌破坏,植物水分和营养元素运输受阻,会出现叶片黄化,逐步发展为整个植物枯萎和死亡。

香蕉枯萎病的防治一直是世界性难题,是一种毁灭性植物病害,目前尚缺乏有效的防治措施(Bubici et al., 2019)。病原菌一旦侵入香蕉维管组织,任何防治药剂都难于直接作用于侵染部位。多种杀菌剂在室内离体条件下对香蕉枯萎病菌表现出优异的抑制活性(Nel et al., 2007),但在大田中防效不佳,原因在于现有内吸性杀菌剂主要具有木质部内吸性,会迅速往植物叶片等蒸腾作用旺盛部位积累,无法在植物维管组织中有效积累(Erwin, 1973; Lehocski-Krsjak et al., 2013)。同时,病原菌一旦侵入木质部,导致蒸腾流受阻,药剂的传导随之受阻。因此,需要开发具有韧皮部传导性的内吸性杀菌剂来防治植物维管组织病害(Tjamos, 1989; Wu et al., 2019)。韧皮部内吸性杀菌剂不仅能通过共质体途径在植物体根系中形成广泛的分布,同时不会因为病原菌侵染而失去在维管组织中的传导能力。

植物韧皮部由活的筛管和伴胞细胞组成,不同于死细胞组成的木质部导管,韧皮部具有较强的选择性,迄今市场上无具备良好韧皮部内吸性的杀菌剂品种。研发韧皮部输导性农药已经成为农药研发的新方向(Wu et al., 2019)。其中,基于韧皮部“离子井”效应的农药结构优化已被证明是开发的有效途径之一(Chollet et al., 2004; 2005)。“离子井”效应是基于植物韧皮部细胞质膜内外的pH差异,质膜外(质外体)呈弱酸性(pH 5~6),弱酸性化合物能扩散通过质膜进入韧皮部(共质体),但在共质体弱碱性

(pH 7.5~8.0)条件下,化合物羧酸基团发生电离,电离后的离子化合物无法再扩散通过质膜,所以弱酸性化合物被限制在韧皮部内,从而形成积累。

Wu et al. (2021)研究发现芳基吡咯非内吸杀菌剂咯菌腈对香蕉枯萎病菌表现出优异的抑制活性,因此被选作活性母体。本研究将在咯菌腈吡咯环的亚胺基上进行弱酸化修饰,引入末端羧酸侧链;通过模式植物蓖麻幼苗研究其韧皮部输导性与“离子井”效应机制;通过盆栽试验研究咯菌腈羧酸衍生物在香蕉植株体内的输导性以及其对香蕉枯萎病的活体活性,以期通过“离子井”效应开发能在香蕉维管组织定向传递的导向杀菌剂,同时为研发防治香蕉枯萎病的新型药剂提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试香蕉、蓖麻及菌株:供试香蕉品种为巴西蕉,香蕉组培苗购于广东省农业科学院果树研究所,移栽到高温灭菌的基质土中(基质土:蛭石=3:1),培育30 d左右,长至5~6叶后进行盆栽试验。蓖麻种子购于淄博市农业科学研究院,在蛭石中培养6 d备用。香蕉枯萎病菌尖孢镰刀菌古巴专化型4号生理小种(Foc4)由广东省农业科学院果树研究所提供。

培养基:马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基成分为马铃薯200 g、葡萄糖20 g、琼脂18 g、蒸馏水1 L;酵母膏胨葡萄糖(yeast extract peptone dextrose, YPD)培养基成分为酵母膏10 g、蛋白胨20 g、葡萄糖20 g、蒸馏水1 L。

药剂及仪器:98%咯菌腈(fludioxonil)原药,广东园田生物工程有限公司;99.5%吗啉乙磺酸(4-morpholinoethanesulfonic acid, MES)和99.5% N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸(2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine] ethanesulfonic acid, HEPES),上海阿拉丁生化科技股份有限公司;色谱级乙腈,美国赛默飞世尔科技公司;其他试剂均为国产分析纯。AV-600M核磁共振波谱仪、FTMS SOLARIX 7T质谱仪,德国Bruker公司;1290 Infinity II超高效液相色谱仪(ultra-performance liquid chromatography, UPLC),美国安捷伦科技公司;Xevo TQD三重四级杆液相质谱联用仪(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS),美国Waters公司。

1.2 方法

1.2.1 咯菌腈羧酸衍生物的合成

将 1.24 g 咯菌腈溶于 30 mL 的 N,N-二甲基甲酰胺溶液中,加入 2.44 g 碳酸铯后于室温下搅拌 1 h。然后滴入 0.7 mL 溴乙酸甲酯,将反应瓶移至油浴中加热至 80℃ 搅拌。待原料反应完毕,加入 1 mol/L 盐酸溶液将反应液调至酸性(pH=2),乙酸乙酯萃取 3 次,用饱和氯化钠溶液洗涤,减压浓缩后经柱层析分离得的目标化合物 1b(图 1)。采用上述同样方法,将溴乙酸甲酯替换成 2-溴丙酸甲酯即可

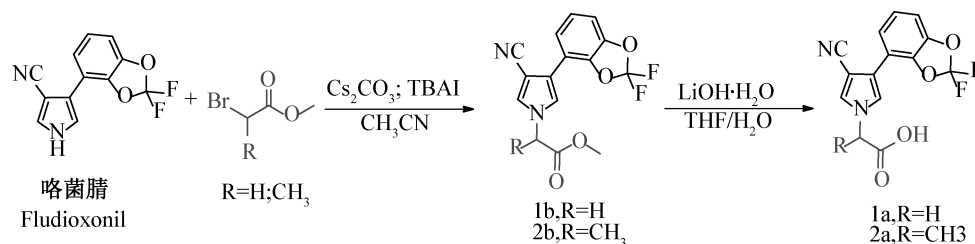


图 1 咯菌腈羧酸衍生物的合成路线

Fig. 1 Synthesis scheme of fludioxonil acidic derivatives

1.2.2 咯菌腈羧酸衍生物的韧皮部输导性

蓖麻幼苗输导性试验参考 Marhadour et al. (2017) 方法进行,分别配制 4 种不同 pH 的蓖麻幼苗子叶缓冲培养液,缓冲培养液中含有 0.1 mmol/L 咯菌腈羧酸衍生物或咯菌腈(对照)、0.25 mmol/L Mg-Cl₂ 和 0.5 mmol/L CaCl₂,其中 pH 5 和 pH 6 的培养液用 20 mmol/L 的 MES 缓冲盐配制,pH 7 和 pH 8 的培养液用 20 mmol/L 的 HEPES 缓冲盐配制。培养液处理蓖麻子叶 2 h 后,切开下胚轴,收集 2 h 内切口处渗出的韧皮部液。收集的韧皮部液经乙腈稀释后用 UPLC 进行分析。UPLC 检测条件:Agilent ZORB-AX SB-C18 色谱柱(内径 4.6 mm×长度 250 mm,填料颗粒直径 5 μm),流动相为乙腈:水=1:1(V/V),进样量 10 μL,流速 0.8 mL/min,检测波长 218 nm。每个化合物每次分别处理 4 株蓖麻幼苗,重复 3 次,每株蓖麻韧皮部收集液单独用 UPLC 检测。此外,基于化合物 log K_{ow} 和 pK_a 建立的 Kleier 模型用于预测所有咯菌腈羧酸衍生物在植物韧皮部的输导性(Kleier,1994)。

1.2.3 咯菌腈羧酸衍生物在香蕉植株上的输导分布

配制含 0.2 mmol/L 羧酸衍生物 1a 或咯菌腈的丙酮水溶液(丙酮:水体积比为 1:9,含 0.15% 有机硅表面活性剂 Silwet L-77),采用涂叶法将药剂施用到香蕉中部叶片,每片叶涂抹 1 mL 药液,每株香蕉涂 2 片叶。施药后第 2、5、7、10、14 天分别采集香蕉植株的上部叶、施药叶、假茎、球茎和根进行分析,检测

合成得到化合物 2b。

将 0.5 g 化合物 1b 溶解于四氢呋喃和水混合溶液中,0℃ 低温下加入 0.13 g 一水氢氧化锂,室温下搅拌过夜。待反应完全后,加入 1 mol/L 的盐酸溶液将反应液调至酸性(pH=2),乙酸乙酯萃取 3 次,干燥浓缩即得咯菌腈羧酸衍生物 1a。将化合物 2b 采用同样的方法合成得到化合物 2a(图 1)。通过 ACD/Labs Percepta 2015 软件对所有目标化合物的油水分配系数(log K_{ow})和电离常数(pK_a)进行计算。

衍生物 1a 和咯菌腈浓度。每个时间点 3 株香蕉,分别检测各部位药剂浓度。

采用 QuEChERS 方法对样品进行前处理(González-Curbelo et al., 2011),提取后的样品过 0.22 μm 有机滤膜过滤后用 LC-MS/MS 进行检测。检测条件:ACQUITY UPLC C18 高效色谱柱(内径 2.1 mm×长度 100 mm,填料颗粒直径 1.7 μm);流动相:A 为 2 mmol/L 乙酸铵溶液,B 为乙腈;流速为 0.2 mL/min,进样量 5 μL,采用梯度洗脱,总运行时间 7 min:0~1 min,65% A;1~5 min,65%~10% A;5~5.5 min,10% A;5.5~6 min,10%~65% A;6~7 min,65% A。质谱参数条件:电喷雾离子源(负离子模式);毛细管电压 3 kV;离子源温度 800℃;脱溶剂气流 1 000 L/h;锥孔电压 25 V。采用多离子检测模式进行分析:咯菌腈定性离子对 m/z 247.2>180,定量离子对 m/z 247.2>126,碰撞能量分别为 25 V 和 30 V;衍生物 1a 定性离子对 m/z 305>91,定量离子对 m/z 305>261,碰撞能量分别为 30 V 和 12 V。

1.2.4 咯菌腈羧酸衍生物对 Foc4 的抑制活性测定

采用菌丝生长速率抑制法测定衍生物的抑制活性(Nel et al., 2007)。分别配制含 0.2 mmol/L 咯菌腈羧酸衍生物的 PDA 培养基,以不带药培养基作对照,在培养基中心接种直径为 5 mm 的 Foc4 菌饼。接菌后的 PDA 平板置于 28℃ 恒温培养箱中黑暗培养 5 d,采用十字交叉法测量菌落直径,计算菌丝生

长抑制率,菌丝生长抑制率=(对照菌落增加直径-处理菌落增加直径)/对照菌落增加直径 $\times 100\%$,重复3次。

1.2.5 衍生物对香蕉枯萎病的盆栽防效试验

参考 Li et al. (2011) 方法对健康香蕉根系进行人工接种,用 YPD 液体培养基摇菌产孢,配制浓度为 1×10^6 个/mL 的 Foc4 菌株孢子悬浮液,每株香蕉根系灌注 Foc4 孢子悬浮液 100 mL。采用 1.2.3 涂叶法测定咯菌腈羧酸衍生物 1a 和咯菌腈对香蕉枯萎病的盆栽防效试验,共施药 2 次,分别在根系接菌前 2 d 和接菌后 5 d 施药,施药浓度为 0.8 mmol/L,以施用等量丙酮水溶液作对照组。每个处理 6 株香蕉,重复 3 次。病情分级:0 级,叶片无可见症状,解剖球茎组织未变褐;1 级,下部叶片开始出现黄化,1%~20% 球茎组织变褐;2 级,所有下部叶片均出现黄化,21%~40% 球茎组织变褐;3 级,所有叶片均出现黄化,41%~60% 球茎组织变褐;4 级,病株枯死,60% 以上球茎组织变褐。接菌 50 d 后对香蕉苗病情指数与防效进行计算 (Huang et al., 2012; Saharan et al.,

2015)。病情指数= $[\sum (\text{相对级数值} \times \text{各级病株数}) / 4 \times \text{调查植株总数}] \times 100\%$,防效=(对照组病情指数-处理组病情指数)/对照组病情指数 $\times 100\%$ 。

1.3 数据分析

试验数据采用 SPSS 25.0 软件进行单因素方差分析,应用 Tukey 法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 咯菌腈羧酸衍生物的合成

在合成目标化合物 1b 和 2b 时,采用不同无机碱开展反应条件筛选,原料始终无法反应完全,目标物不易被分离纯化。将反应溶剂替换成 N,N-二甲基甲酰胺后,升温至 80℃ 搅拌过夜,即可反应完全。选用一水氢氧化锂为无机碱将咯菌腈羧酸酯衍生物进行水解反应,化合物 1a 和 2a 的合成产率分别为 91% 和 88%,且反应后处理方便。目标化合物的核磁共振氢谱、核磁共振碳及高分辨质谱数据如表 1 所示。

表 1 咯菌腈衍生物的特征数据

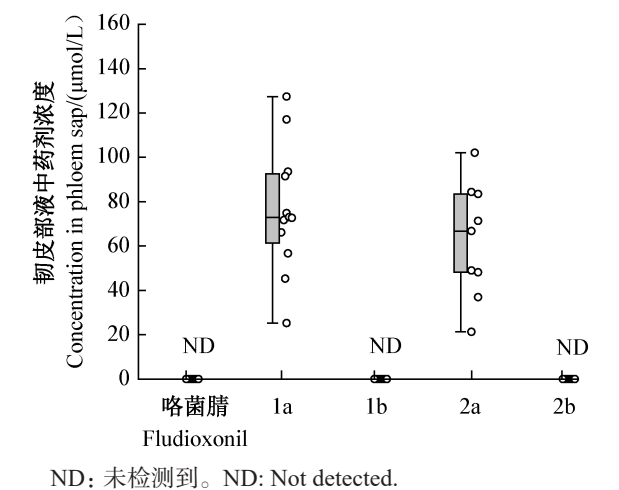
Table 1 Structural characterization data of fludioxonil acidic derivatives

化合物 Compound	核磁共振氢谱 ^1H nuclear magnetic resonance/600 MHz	核磁共振碳谱 ^{13}C nuclear magnetic resonance/151 MHz	高分辨质谱(电喷雾离子源) High resolution mass spectrum (electron spray ionization)
1a	(DMSO- d_6) δ 7.81 (d, $J=1.7$ Hz, 1H), 7.55 (dd, $J=6.4, 3.1$ Hz, 1H), 7.44 (d, $J=1.7$ Hz, 1H), 7.31~7.24 (m, 2H), 4.95 (s, 2H)	(DMSO- d_6) δ 170.0, 143.6, 139.4, 133.1, 131.4 (t, $J=252.8$ Hz), 125.3, 124.9, 121.9, 117.0, 116.8, 116.7, 108.8, 90.3, 51.1	Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_8\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_4$ [M-H] ⁻ 305.0368, found 305.0379
2a	(DMSO- d_6) δ 7.97 (d, $J=2.2$ Hz, 1H), 7.53 (dd, $J=7.8, 1.4$ Hz, 1H), 7.48 (d, $J=2.2$ Hz, 1H), 7.36~7.32 (m, 1H), 7.32~7.27 (m, 1H), 5.20 (q, $J=7.4$ Hz, 1H), 1.70 (d, $J=7.4$ Hz, 3H)	(DMSO- d_6) δ 172.1, 143.6, 139.5, 131.4 (t, $J=252.8$ Hz), 131.4, 125.3, 123.3, 122.2, 117.0, 116.9, 116.7, 108.9, 90.4, 57.7, 18.1	Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_4$ [M-H] ⁻ 319.0525, found 319.0536
1b	(CDCl ₃) δ 7.72 (dd, $J=8.2, 1.0$ Hz, 1H), 7.29 (d, $J=2.4$ Hz, 1H), 7.19 (d, $J=2.4$ Hz, 1H), 7.14 (t, $J=8.1$ Hz, 1H), 6.98 (dd, $J=8.0, 1.1$ Hz, 1H), 4.72 (s, 2H), 3.83 (s, 3H)	(CDCl ₃) δ 167.5, 144.0, 140.0, 131.5 (t, $J=255.0$ Hz), 130.9, 124.3, 123.6, 121.4, 119.2, 116.2, 116.1, 108.2, 92.7, 53.2, 51.3	Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_4$ [M-H] ⁻ 319.0525, found 319.0532
2b	(CDCl ₃) δ 7.72 (dd, $J=8.1, 1.1$ Hz, 1H), 7.38 (d, $J=2.4$ Hz, 1H), 7.24 (d, $J=2.4$ Hz, 1H), 7.14 (t, $J=8.1$ Hz, 1H), 6.98 (dd, $J=8.0, 1.1$ Hz, 1H), 4.84 (q, $J=7.3$ Hz, 1H), 3.79 (s, 3H), 1.81 (d, $J=7.3$ Hz, 3H)	(CDCl ₃) δ 170.1, 143.8, 139.8, 131.4 (t, $J=252.8$ Hz), 128.8, 124.1, 121.7, 121.3, 118.7, 116.2, 116.1, 108.0, 92.2, 57.9, 53.1, 18.3	Calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_4$ [M-H] ⁻ 333.0681, found 333.0692

2.2 衍生物在蓖麻韧皮部的输导性与装载机制

采用蓖麻幼苗测定了母体化合物咯菌腈、咯菌腈羧酸衍生物 1a 和 2a 以及羧酸酯衍生物 1b 和 2b 在植物韧皮部的输导性,结果显示,非内吸杀菌剂咯菌腈在蓖麻韧皮部液中未检测到,表明其本身不具有韧皮部输导性,经过羧酸基团修饰以后,羧酸衍生物

1a 和 2a 均能在韧皮部液中被检测到,浓度分别达到 72.8 $\mu\text{mol/L}$ 和 66.7 $\mu\text{mol/L}$,表现出良好的韧皮部输导性(图 2)。羧酸酯衍生物 1b 和 2b 则均没有韧皮部输导性,表明羧酸基团的电离对衍生物的韧皮部输导性至关重要。



ND: 未检测到。ND: Not detected.

图2 咯菌腈衍生物在pH 5条件下蓖麻幼苗韧皮部的输导性

Fig. 2 Phloem transport of fludioxonil derivatives in the castor bean model at pH 5

分析羧酸衍生物 1a 在不同 pH 条件下韧皮部的装载,结果显示,随着 pH 升高,衍生物 1a 的检出浓度逐渐降低,韧皮部输导性与 pH 呈明显负相关性;当 pH 为 8 时,衍生物 1a 浓度仅为 3.5 $\mu\text{mol/L}$,与 pH 5 时的浓度降低超过 95%(图 3),说明细胞膜内外 pH 差异显著影响衍生物 1a 的韧皮部装载过程。

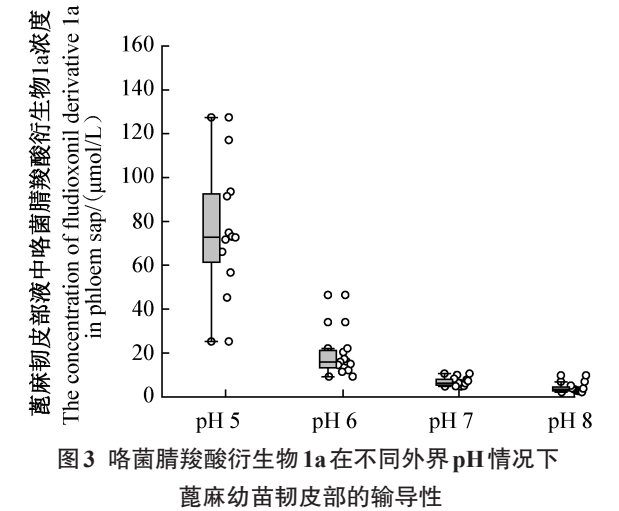


图3 咯菌腈羧酸衍生物 1a 在不同外界 pH 情况下蓖麻幼苗韧皮部的输导性

Fig. 3 Phloem transport of fludioxonil acidic derivative 1a in the castor bean model at different external pH values

在不同 pH 下羧酸衍生物 1a 和 2a 的 $\log K_{ow}$ 值不

同,而咯菌腈和羧酸酯衍生物 1b 和 2b 的 $\log K_{ow}$ 值无变化(表 2)。根据 Kleier 模型预测结果所示,咯菌腈的理化参数不符合模型韧皮部输导的要求(图 4),与蓖麻检测结果相符。在羧酸基团修饰以后,衍生物 1a 和 2a 的理化性质发生了显著改变, $\log K_{ow}$ 值降低使其跨膜能力发生变化,在非电离情况下(pH 5)进入中等韧皮部输导性范围。随着 pH 升高到 8,衍生物 1a 和 2a 发生电离, $\log K_{ow}$ 值分别降低至 -1.94 和 -1.64,衍生物电离后亲水性增加导致跨膜能力减弱,在 Kleier 模型中进入无韧皮部输导性范围(图 4),预测结果与蓖麻检测结果相符。羧酸酯衍生物 1b 和 2b 的理化性质与母体化合物咯菌腈基本相同,预测结果与蓖麻检测结果均显示不具备韧皮部输导性。表明羧酸官能团的引入可以显著改善衍生物的理化参数,使其在韧皮部内外不同 pH 情况下表现出不同的跨膜能力,从而通过“离子井”效应实现了在植物韧皮部的装载。

2.3 咯菌腈羧酸衍生物在香蕉植株上的输导分布

通过 LC-MS/MS 检测了衍生物 1a 在香蕉植株中的输导性与降解情况。结果显示,咯菌腈在植株中的内吸性很有限,施用剂量 50% 左右停留在施药叶中(图 5-A)。仅发现微弱的向上传导性(图 5-B),无向球茎和根系传导的能力(图 5-C~D),说明咯菌腈只具有较弱的木质部内吸性,不具有韧皮部内吸性。与之相反,衍生物 1a 经叶部施药后,在施药叶中浓度降低较快(图 5-E),说明其可能更快被吸收传导到植物其他部分。衍生物 1a 在香蕉体内表现出了双向传导能力,且可逐渐降解释放出咯菌腈(图 5-F~H)。衍生物 1a 可通过韧皮部向下传递到香蕉球茎和根部,球茎中的最高检测浓度为施药后 5 d 时的 0.023 $\mu\text{mol/L}$,根部的最高检测浓度为施药后 2 d 时的 0.017 $\mu\text{mol/L}$ (图 5-G~H)。此外,在球茎和根部均检测到原本不能长距离输导的母体化合物咯菌腈,球茎在施药 5 d 后到达峰值浓度 0.044 $\mu\text{mol/L}$ (图 5-G)。表明改善药剂的韧皮部输导性可使药剂向香蕉球茎和根部传递,衍生物 1a 表现出了前体药物特性。

表 2 咯菌腈羧酸衍生物的理化性质					
Table 2 Predicted physicochemical properties of fludioxonil acidic derivatives					
化合物 Compound	油水分分配系数 1-octanol/water partition coefficients ($\log K_{ow}$)				pK_a
	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	
咯菌腈 Fludioxonil	2.57	2.57	2.57	2.57	14.10
1a	0.57	-0.41	-1.34	-1.94	2.47
2a	0.87	-0.11	-1.04	-1.64	2.56
1b	2.56	2.56	2.56	2.56	-
2b	2.93	2.93	2.93	2.93	-

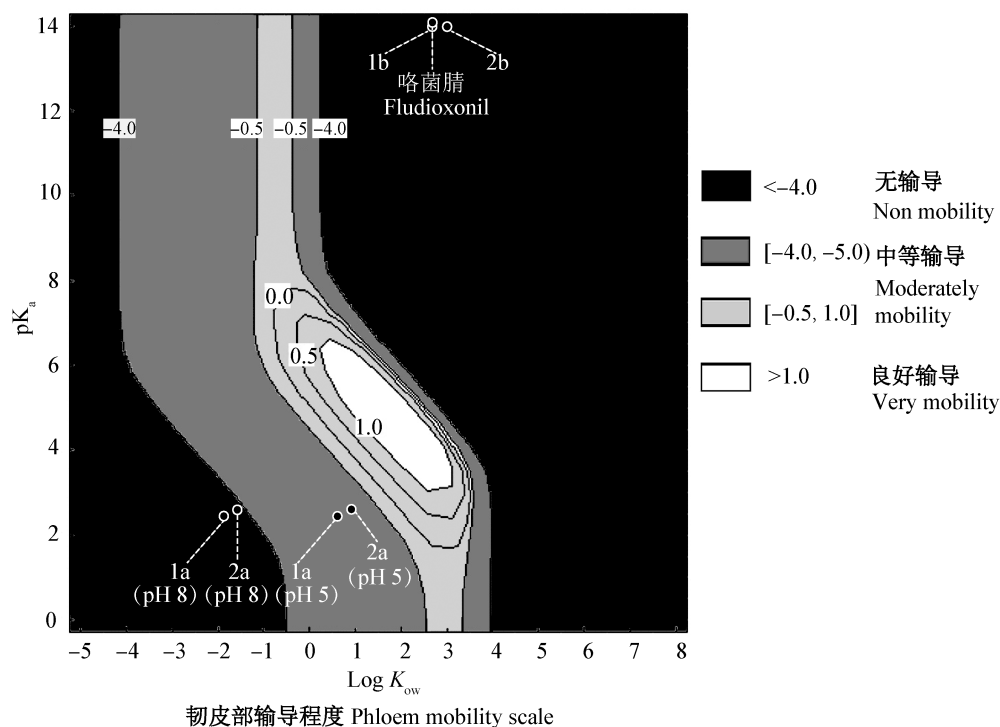


图4 Kleier数学模型预测咯菌腈羧酸衍生物在韧皮部的输导性

Fig. 4 Prediction of phloem mobility of fludioxonil acidic derivatives using Kleier map

2.4 咯菌腈羧酸衍生物对香蕉枯萎病的盆栽防效

抑菌试验结果表明,所有咯菌腈衍生物对香蕉枯萎病菌 Foc4 的抑制活性均显著低于咯菌腈(表3)。在 0.2 mmol/L 浓度下,所有衍生物均未对病原菌菌丝生长产生明显抑制效果,抑制率仅为 4.9%~6.7%,均显著低于咯菌腈的 99.2%(表3)。表明羧酸基团的引入显著降低了衍生物抑菌活性。

进一步通过盆栽试验评价衍生物 1a 对香蕉枯萎病的防效。根据输导性试验结果,将施药浓度提高到 0.8 mmol/L,结果显示,衍生物 1a 处理后香蕉植株的病情指数显著低于对照和咯菌腈原药处理组(表4)。对照和咯菌腈原药处理组的香蕉球茎中发现明显黑褐色病变,而衍生物 1a 处理组球茎无明显变色或仅边缘有轻微变色。衍生物 1a 处理组的病情指数为 27.8,显著低于对照和咯菌腈原药处理组病情指数的 61.1 和 56.9,表现出 54.5% 的防效(表4)。

3 讨论

植物韧皮部液收集非常困难,所以检测化合物在植物韧皮部的输导性在技术上存在一定难度,通常需要利用一些特殊的模式植物。蓖麻幼苗是广泛应用于研究外源化合物韧皮部输导性的植物模型(Rocher et al., 2006; Wu et al., 2012),同时蓖麻幼苗

子叶没有蜡质层,被称为“开放质外体”,其质外体 pH 可受外界培养液 pH 直接影响(Komor et al., 2007),是“离子井”效应机制研究的理想植物模型(Chollet et al., 2004)。Wu et al. (2017) 研究结果表明,蓖麻幼苗韧皮部 pH 在 7.5~8 之间,当外界培养液 pH 为 8 时,韧皮部质膜内外 pH 差消失。本研究中衍生物 1a 在外界 pH 为 8 时几乎丧失韧皮部转载能力,结合 Kleier 模型的预测结果证明了“离子井”效应是衍生物 1a 具有韧皮部输导性的主要机制。

内吸传导性影响农药在植物体内到达作用靶点的有效剂量,从而影响药剂的生物活性(David, 2017)。开发具有韧皮部传导性的药剂能更有效地防治根部或维管组织病虫害(Yao et al., 2017; Wu et al., 2019)。基于“离子井”效应,Chollet et al. (2004; 2005) 最早对芳基吡咯类杀菌剂拌种咯进行了弱酸化改造,羧酸基团引入使得原本非内吸性的拌种咯具有了韧皮部输导性,被用于防治葡萄土传病害。Wu et al. (2020) 随后研究发现,拌种咯羧酸衍生物 SM 26 在葡萄植株中具有双向传导性,可以通过韧皮部将药剂从叶片传递到根部,但由于药剂的韧皮部输导能力不足,导致根部积累剂量无法直接发挥防效。本研究中咯菌腈羧酸衍生物 1a 表现出了更高的韧皮部输导能力,蓖麻韧皮部液检出浓度比拌种咯羧酸衍生物提高了 2.3 倍(Chollet et al., 2005)。

本试验还发现,在具备韧皮部传导性后,衍生物 1a 茎和根部。证明了基于“离子井”效应的药剂开发策略能够在香蕉植株中双向传导,最后被传递到植株球略在香蕉上的有效性。

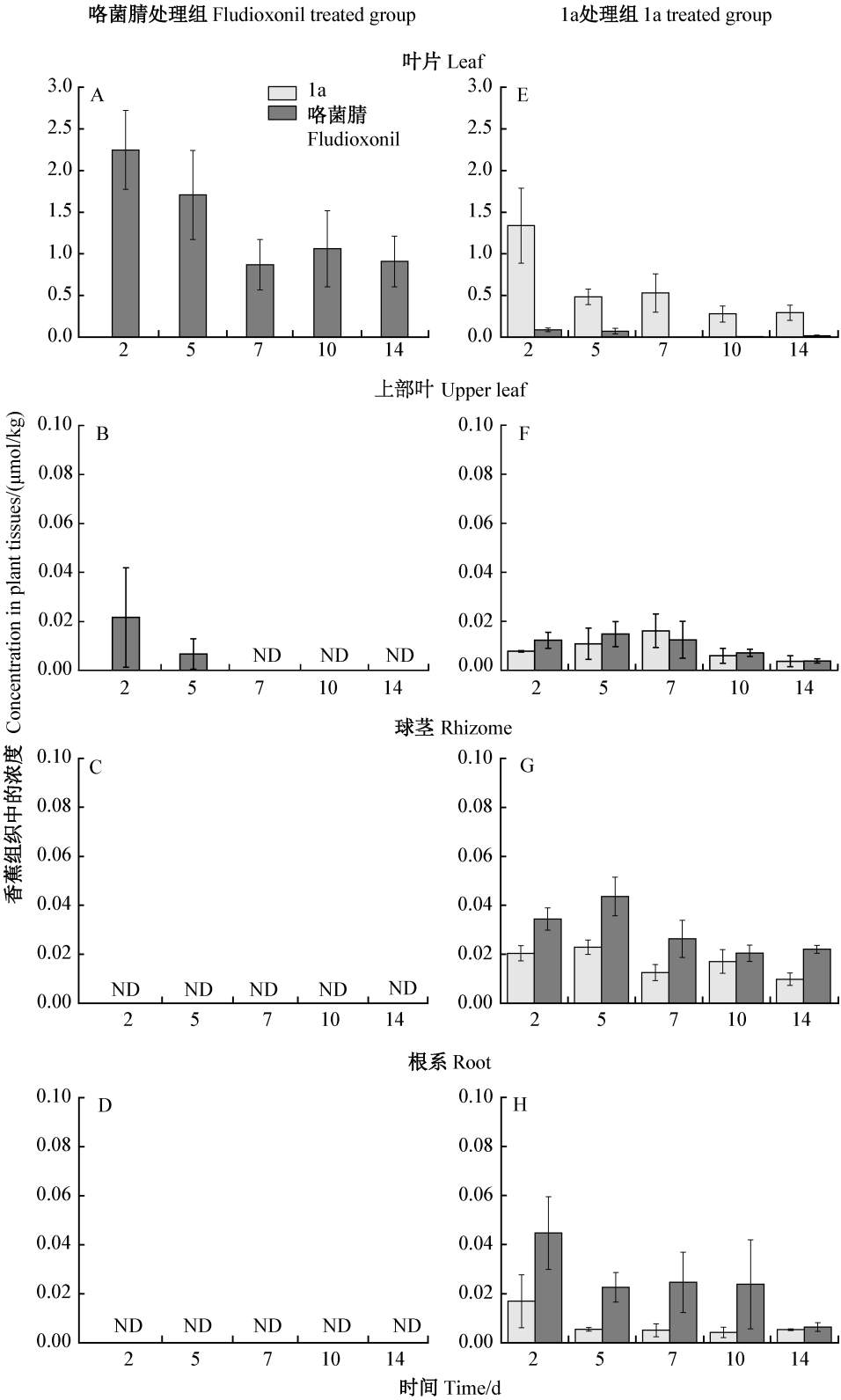


图5 咯菌腈羧酸衍生物 1a 和咯菌腈在香蕉植株中的输导分布

Fig. 5 Translocation of fludioxonil acidic derivative 1a and fludioxonil in different parts of banana plants

表3 咯菌腈衍生物对香蕉枯萎病菌 *Foc4* 菌丝生长的抑制活性

Table 3 *In vitro* antifungal activity of the fludioxonil acidic derivatives against mycelial growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4

处理组 Treatment	抑制率 Inhibition/%
0.2 mmol/L 咯菌腈	99.2±0.5 a
0.2 mmol/L fludioxonil	
0.2 mmol/L 1a	4.9±0.5 b
0.2 mmol/L 2a	5.2±1.0 b
0.2 mmol/L 1b	6.7±0.4 b
0.2 mmol/L 2b	5.2±0.1 b

表中数据均为平均数±标准误。同列不同字母表示经 Tukey 法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SE. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ by Tukey test.

表4 咯菌腈羧酸衍生物 1a 对香蕉枯萎病菌 *Foc4* 的盆栽防效
Table 4 Efficacy of fludioxonil acidic derivative 1a against banana *Fusarium* wilt caused by *Foc4* in green-house

处理组 Treatment	病情指数 Disease index/%	防效 Efficacy/%
对照组 CK	61.1±2.8 a	—
0.8 mmol/L 1a	27.8±1.4 b	54.5
0.8 mmol/L 咯菌腈	56.9±1.4 a	6.5
0.8 mmol/L fludioxonil		

表中数据均为平均数±标准误。同列不同字母表示经 Tukey 法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SE. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ by Tukey test.

此前有向香蕉地上部分注入带药胶囊,从而使药剂直接进入香蕉体内的研究(蒲小明等,2015),但局部大量用药容易造成不良反应或组织破坏,施用过程也较为繁琐,未见在生产中大规模应用。开发具有维管组织靶向性的导向杀菌剂,通过植物叶片吸收将药剂传导分布到病原菌侵染的地下部位,施药方便且剂量容易控制。本团队 Wu et al.(2021)采用靶向纳米载体负载咯菌腈,已经实现了咯菌腈向香蕉球茎和根部的靶向传递,对香蕉枯萎病表现出了一定的防效。与本研究基于“离子井”效应结构修饰的小分子化合物相比,在施药浓度相近的情况下,小分子咯菌腈衍生物 1a 在香蕉体内的输导性优于靶向纳米载体,药剂在球茎中的检出浓度约是纳米材料的 5 倍左右,但最终的盆栽试验数据差异不大,推测可能与药剂代谢速率有关,纳米载体缓释效果可能提高了药剂在香蕉体内的持效期,未来将开展两者结合的研究。总之,韧皮部靶向给药的研究结果

说明了类似提高药剂内吸传导性的策略有望成为未来化学防治香蕉枯萎病的主要方向(李华平等,2019)。

前体农药已经被认为是改善药剂生物利用度和提高有效利用率的重要方法(Salgado & David, 2017)。本研究基于“离子井”效应的弱酸化改造可作为一种药剂前体化策略。羧酸基团引入显著提升了农药分子的输导性,并在香蕉植株体内降解释放活性母体化合物,从而在植物特定部位发挥活性。同时,前体化策略有助于解决内吸性农药残留风险问题。对非内吸性药剂的导向化修饰暂时增加其内吸输导性,在进入植物后如能释放活性母体,非内吸活性成分将主要停留在特定部位,减少了二次分布,从而降低了对随后生长部位的残留污染,例如花或果实(Wu et al., 2019)。后期可以通过优化前体基团与母体的链接臂结构来调节活性中心代谢释放程度,从而进一步提高导向杀菌剂的生物活性以及控制其残留动态。

综上所述,本研究根据“离子井”效应开发了具有韧皮部传导性的导向咯菌腈羧酸衍生物,其中衍生物 1a 在香蕉植株体内表现出了双向输导能力,可以通过叶部吸收向下传递到球茎与根系等病原菌侵染部位,并释放活性母体,同时在盆栽试验中表现出显著的防效,由此说明,韧皮部导向杀菌剂策略有望成为香蕉枯萎病化学防治的新途径。

参 考 文 献 (References)

- Bubici G, Kaushal M, Prigigallo MI, Cabanás CG L, Mercado-Blanco J. 2019. Biological control agents against *Fusarium* wilt of banana. *Frontiers in Microbiology*, 10: 616
- Chollet JF, Rocher F, Jousse C, Delétage-Grandon C, Bashiardes G, Bonnemain JL. 2004. Synthesis and phloem mobility of acidic derivatives of the fungicide fenpiclonil. *Pest Management Science*, 60(11): 1063–1072
- Chollet JF, Rocher F, Jousse C, Deletage-Grandon C, Bashiardes G, Bonnemain JL. 2005. Acidic derivatives of the fungicide fenpiclonil: effect of adding a methyl group to the N-substituted chain on systemicity and fungicidal activity. *Pest Management Science*, 61(4): 377–382
- David MD. 2017. Insecticide ADME for support of early-phase discovery: combining classical and modern techniques. *Pest Management Science*, 73(4): 692–699
- Dita M, Barquero M, Heck D, Mizubuti ESG, Staver CP. 2018. *Fusarium* wilt of banana: current knowledge on epidemiology and research needs toward sustainable disease management. *Frontiers in Plant Science*, 9: 1468
- Erwin DC. 1973. Systemic fungicides: disease control, translocation, and mode of action. *Annual Review of Phytopathology*, 11: 389–

- 422
- González-Curbelo MÁ, Hernández-Borges J, Ravelo-Pérez LM, Rodríguez-Delgado MÁ. 2011. Insecticides extraction from banana leaves using a modified QuEChERS method. *Food Chemistry*, 125(3): 1083–1090
- Guo LJ, Yang LY, Liang CC, Wang GF, Dai QD, Huang JS. 2015. Differential colonization patterns of bananas (*Musa* spp.) by physiological race 1 and race 4 isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Journal of Phytopathology*, 163(10): 807–817
- Huang YH, Wang RC, Li CH, Zuo CW, Wei YR, Zhang L, Yi GJ. 2012. Control of *Fusarium* wilt in banana with Chinese leek. *European Journal of Plant Pathology*, 134(1): 87–95
- Kleier DA. 1994. Phloem mobility of xenobiotics V: structural requirements for phloem systemic pesticides. *Pesticide Science*, 42(1): 1–11
- Komor E, Orlich G, Bauer-Ruckdeschel H. 2007. Relationship between apoplastic nutrient concentrations and the long-distance transport of nutrients in the *Ricinus communis* L. seedling.//Sattelmacher B, Horst WJ. The apoplast of higher plants: compartment of storage, transport and reactions. Dordrecht: Springer, pp. 231–249
- Lehoczki-Krsjak S, Varga M, Szabó-Hevér Á, Mesterházy Á. 2013. Translocation and degradation of tebuconazole and prothioconazole in wheat following fungicide treatment at flowering. *Pest Management Science*, 69(11): 1216–1224
- Li CQ, Yang JH, Li WB, Sun JB, Peng M. 2017. Direct root penetration and rhizome vascular colonization by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* are the key steps in the successful infection of Brazil Cavendish. *Plant Disease*, 101: 2073–2078
- Li CY, Chen S, Zuo CW, Sun QM, Ye Q, Yi GJ, Huang BZ. 2011. The use of GFP-transformed isolates to study infection of banana with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4. *European Journal of Plant Pathology*, 131(2): 327–340
- Li HP, Li YF, Nie YF. 2019. Research status of occurrence and control of *Fusarium* wilt of banana. *Journal of South China Agricultural University*, 40(5): 128–136 (in Chinese) [李华平, 李云峰, 聂燕芳. 2019. 香蕉枯萎病的发生及防控研究现状. 华南农业大学学报, 40(5): 128–136]
- Marhadour S, Wu HX, Yang W, Marivingt-Mounir C, Bonnemain JL, Chollet JF. 2017. Vectorisation of agrochemicals via amino acid carriers: influence of the spacer arm structure on the phloem mobility of phenylpyrrole conjugates in the *Ricinus* system. *Pest Management Science*, 73(9): 1972–1982
- Nel B, Steinberg C, Labuschagne N, Viljoen A. 2007. Evaluation of fungicides and sterilants for potential application in the management of *Fusarium* wilt of banana. *Crop Protection*, 26(4): 697–705
- Ploetz RC. 2015. *Fusarium* wilt of banana. *Phytopathology*, 105(12): 1512–1521
- Pu XM, Lin BR, Shen HF, Zhang JX, Li PQ, Pan QY. 2015. A capsula formulation of fungicide for controlling banana *Fusarium* wilt disease and its application. *Plant Protection*, 41(1): 185–189 (in Chinese) [蒲小明, 林璧润, 沈会芳, 张景欣, 李培谦, 潘群英. 2015. 防治香蕉枯萎病胶囊药剂研制与应用. 植物保护, 41(1): 185–189]
- Rocher F, Chollet JF, Jousse C, Bonnemain JL. 2006. Salicylic acid, an ambimobile molecule exhibiting a high ability to accumulate in the phloem. *Plant Physiology*, 141(4): 1684–1693
- Saharan V, Sharma G, Yadav M, Choudhary MK, Sharma SS, Pal A, Raliya R, Biswas P. 2015. Synthesis and *in vitro* antifungal efficacy of Cu-chitosan nanoparticles against pathogenic fungi of tomato. *International Journal of Biological Macromolecules*, 75: 346–353
- Salgado VL, David MD. 2017. Chance and design in proinsecticide discovery. *Pest Management Science*, 73(4): 723–730
- Stokstad E. 2019. Banana fungus puts Latin America on alert. *Science*, 365(6450): 207–208
- Tjamos EC. 1989. Problems and prospects in controlling *Verticillium* wilt.//Tjamos EC, Beckman CH. Vascular wilt diseases of plants: basic studies and control. Berlin Heidelberg: Springer, pp. 441–456
- Wu HX, Hu PT, XU Y, Xiao CX, Chen ZB, Liu XJ, Jia JL, Xu HH. 2021. Phloem delivery of fludioxonil by plant amino acid transporter-mediated polysuccinimide nanocarriers for controlling *Fusarium* wilt in banana. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(9): 2668–2678
- Wu HX, Marhadour S, Lei ZW, Dugaro É, Gaillard C, Porcheron B, Marivingt-Mounir C, Lemoine R, Chollet JF, Bonnemain JL. 2017. Use of D-glucose-fenpiclonil conjugate as a potent and specific inhibitor of sucrose carriers. *Journal of Experimental Botany*, 68(20): 5599–5613
- Wu HX, Spagnolo A, Marivingt-Mounir C, Clément C, Fontaine F, Chollet JF. 2020. Evaluating the combined effect of a systemic phenylpyrrole fungicide and the plant growth-promoting rhizobacteria *Paraburkholderia phytofirmans* (strain PsJN::gfp2x) against the grapevine trunk pathogen *Neofusicoccum parvum*. *Pest Management Science*, 76(11): 3838–3848
- Wu HX, Xu HH, Marivingt-Mounir C, Bonnemain JL, Chollet JF. 2019. Vectorizing agrochemicals: enhancing bioavailability via carrier-mediated transport. *Pest Management Science*, 75(6): 1507–1516
- Wu HX, Yang W, Zhang ZX, Huang T, Yao GK, Xu HH. 2012. Uptake and phloem transport of glucose-fipronil conjugate in *Ricinus communis* involve a carrier-mediated mechanism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(24): 6088–6094
- Yao GK, Wen YJ, Zhao C, Xu HH. 2017. Novel amino acid ester-chlorantraniliprole conjugates: design, synthesis, phloem accumulation and bioactivity. *Pest Management Science*, 73(10): 2131–2137
- Zhou DB, Jing T, Zhang XY, Qi DF, Chen YF, Wang F. 2016. Screening and antibacterial activity of antagonistic bacteria against banana *Fusarium* wilt disease. *Journal of Plant Protection*, 43(6): 913–921 (in Chinese) [周登博, 井涛, 张锡炎, 起登凤, 陈宇丰, 王飞. 2016. 香蕉枯萎病拮抗菌筛选及其抑菌活性. 植物保护学报, 43(6): 913–921]

(责任编辑:王璇)