

· 研究论文 ·

草莓枯萎病菌抗戊唑醇突变体 ZY-W 的生理生化特性

姜莉莉¹, 王红艳², 夏晓明¹, 林 璘¹, 王开运^{*1}

(1. 山东农业大学 植物保护学院, 山东 泰安 271018;

2. 山东省农业科学院 棉花研究中心, 济南 250100)

摘要:为明确抗戊唑醇草莓枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* 突变体 ZY-W 的生理生化特性, 分析其抗性风险及可能的抗性机制, 比较了对戊唑醇抗性达 34.2 倍的 ZY-W 和敏感菌株 ZY 在苯丙氨酸解氨酶(PAL)及过氧化物酶(POD)活力、对渗透压的敏感性、相对渗率、可溶性蛋白含量及酯酶同工酶图谱等方面的差异。结果表明: ZY-W 突变菌株体内的 POD 和 PAL 活力均高于 ZY; 经不同浓度药剂处理 0~24 h, 2 菌株 PAL 活力均呈先上升后下降的趋势, 并在处理后 1.5 h 达到最高值; 2 菌株的 POD 活力则一直处于上升状态, 24 h 时达到最高值, 且此时 2 菌株间 POD 活力差异最大; 仅用清水处理 0~24 h, 2 菌株的 PAL 和 POD 活力均一直处于上升状态。在不同处理时间及药剂浓度下, ZY 的相对渗率为 ZY-W 的 1.0~2.4 倍, 表明 ZY-W 菌株的细胞膜透性低于 ZY; ZY-W 对渗透压的敏感性及体内可溶性蛋白含量均显著高于 ZY, 其中 ZY-W 的可溶性蛋白含量是 ZY 的 1.3 倍; 在突变菌株 ZY-W 的酯酶同工酶图谱中发现了 R_f 值为 0.24 的特征性谱带。表明草莓枯萎病菌对戊唑醇产生抗性的同时, 伴随着其生理生化特性的改变。

关键词:草莓枯萎病菌; 戊唑醇; 抗性突变体; 抗性机制; 生理生化特性

DOI: 10.3969/j.issn.1008-7303.2012.01.06

中图分类号: S481.4; S482.2

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2012)01-0042-09

Physiological and biochemical characteristics of tebuconazole-resistant isolate of *Fusarium oxysporum* ZY-W

JIANG Lili¹, WANG Hongyan², XIA Xiaoming¹, LIN Jin¹, WANG Kaiyun^{*1}

(1. College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, Shandong Province, China;

2. Cotton Research Centre, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Ji'nan 250100, China)

Abstract: To determine the physiological and biochemical characteristics of tebuconazole-resistant isolate of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* ZY-W, and calculate the resistance risk and mechanism, comparison was conducted between the resistant isolate ZY-W and the sensitive isolate ZY on the activity of phenylalanine ammonia lyase (PAL) and peroxidase (POD), the osmolarity sensitivity, the relative leakage, solution protein contents and electrophoretic patterns of esterases. The result showed that the activity of POD and PAL of ZY-W was higher than that of ZY at all time. The value of PAL treated by fungicide for 0-24 h was increased firstly and then decreased, and reached the peak at 1.5 h. The value of POD in the two isolates was rising all the time, and reached the top at the 24th

收稿日期: 2011-11-16; 修回日期: 2011-12-26.

作者简介: 姜莉莉, 女, 硕士研究生, E-mail: j-lili@163.com; * 通信作者 (Author for correspondence); 王开运, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事农药毒理与有害生物抗性研究, E-mail: kywang@sdau.edu.cn

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项(200903033).

hour, and the difference between two isolates reached the top at that time. The activity of PAL and POD in both isolates was rising after treated by double distilled water for 0–24 h. Under different conditions, ZY could leak more electrolyte than ZY-W, which means that cell membrane permeability of ZY-W is relatively low. Differences were also found in osmolarity and soluble protein content between two isolates, and the soluble protein content of ZY-W was 0.3 folds higher than that of ZY. In the electrophoretic patterns of esterases, one characteristic band was found in ZY-W. As the result showed, the development of fungicide resistance was accompanied by the changes of the physiology and biochemistry characteristics.

Key words: *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*; tebuconazole; resistant mutant; resistance mechanism; physiology and biochemistry characteristics

草莓枯萎病是由半知菌亚门瘤座菌科尖孢镰刀菌草莓专化型 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *Fragariae*, 草莓枯萎病菌) 引起的一种重要土传病害, 由于草莓特殊的栽培条件及多年生种植方式, 使得该病害在各主产区发生普遍且日趋严重^[1]。杨焕青^[2]、曾富春^[3]、郑莉^[4]等均对该病原菌的生物学特性进行过报道。生产上常用多菌灵和戊唑醇等药剂进行防治^[5]。戊唑醇是 1, 2, 4-三唑类杀菌剂^[6], 由于其独特的作用机制而被广泛使用^[7-8], 现已成为防治小麦、玉米、蔬菜、水稻等作物上病害的主要药剂之一^[9-10], 但因其作用位点单一及频繁使用, 已导致病原菌抗药性增强及田间防治效果降低。目前, 已有报道发现了富克葡萄孢盘菌 *Botryotinia fuckeliana*^[11]、大麦云斑病菌 *Rhynchosporium secalis*^[12]、葡萄座腔菌 *Botryosphaeria dothidea*^[13]、草莓枯萎病菌^[14]等多种病原菌对戊唑醇的抗药性, 夏晓明等^[15]还报道了禾谷丝核菌对戊唑醇的抗性机制。

植物病原菌对药剂产生抗性的同时, 会伴随着其体内生理生化功能的改变, 如抗逆酶活性^[16]、对渗透压的敏感性^[17]、细胞膜透性^[18-19]、可溶性蛋白含量及酯酶同工酶图谱^[20-21]等。目前尚未见关于草莓枯萎病菌抗戊唑醇突变体生理生化特性的系统报道, 而该特性对探明菌株的抗药性机理及进行抗性风险评估具有重要意义。笔者以草莓枯萎病菌抗戊唑醇突变体 ZY-W 和敏感菌株 ZY 为试材, 研究比较了该突变体的各项生理生化特性。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 菌株 ZY 为供试敏感菌株, 采自山东省招远市大棚草莓种植园。采用常规组织分离法分离, 于马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA) 平板上、28 °C

培养。观察菌落形态及大、小型分生孢子和厚垣孢子着生情况及形态特征, 并依据 Booth 报道的镰刀菌分类标准^[22]和徐存忠等^[23]的方法进行鉴定。将分离得到的草莓枯萎病菌接种到温室盆栽草莓上, 进一步进行分离纯化, 确定所采菌株均为草莓枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*。ZY-W 为戊唑醇抗性菌株, 在前期研究^[14]中, 利用含有戊唑醇的 PDA 培养基进行 36 代连续抗性选育, 抗性倍数达 34.2, 且其抗性可以稳定遗传。

1.1.2 药剂及试剂 97% 戊唑醇 (tebuconazole) 原粉 (山东华阳科技股份有限公司), 用丙酮溶解并配成 1 000 μg/mL 的戊唑醇母液, 试验时再用重蒸水稀释至各所需浓度; 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP, 进口分装)、L-苯丙氨酸、愈创木酚及其余试剂均为分析纯, 10 × Buffer 购于大连宝生物公司。

1.1.3 主要仪器 UV-2201 紫外分光光度计 (日本岛津); CR22 高速冷冻离心机 (日本日立); DYY-6D 型电泳仪 (北京市六一仪器厂); 六一 DDS-11A 型电导仪 (上海雷磁仪器厂)。

1.2 实验方法

1.2.1 苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 活力测定

1.2.1.1 样品制备 将供试菌株 ZY-W 和 ZY 在 PDA 培养基上于 28 °C 培养 7 d, 制成直径 7 mm 的菌碟, 分别接入 PDA 平板上培养 10 d。刮取新鲜菌丝, 经重蒸水冲洗、真空抽滤近干后称取鲜菌丝 3.0 g, 放入锥形三角瓶中, 分别加入质量浓度为 1.0、5.0 和 25.0 μg/mL 的多菌灵药液, 于 28 °C 恒温水浴中、120 r/min 下分别振荡培养 0、1.5、6 和 24 h。将各处理菌丝用重蒸水冲洗 5 次, 真空抽滤后冻干备用。以不加药剂者为对照, 每个处理重复 3 次。

1.2.1.2 酶液制备 每份样品取冻干菌丝 2.0 g, 置于预冷的研钵中, 加入少量液氮、石英砂和少许

PVP,在冰浴中充分研磨后迅速转入塑料离心管中,加入 10.0 mL、0.1 mol/L 的硼酸缓冲液(pH 8.7,含 1×10^{-3} mol/L 的 EDTA 和 20×10^{-3} mol/L 的 β -巯基乙醇),平衡后于 10 000 r/min、4 °C 下离心 30 min,上清液即为酶液,置于冰浴中待用。

1.2.1.3 酶活力测定 参照李合生^[24]的方法。经多次预备试验确定酶反应体系为:硼酸缓冲液(pH 8.7) 2.0 mL、酶液 0.5 mL、0.02 mol/L 的 L-苯丙氨酸 1 mL。对照用 0.5 mL 缓冲液代替酶液。40 °C 下反应 60 min 后用 0.5 mL、6 mol/L 的盐酸终止反应。用紫外分光光度计在 290 nm 处测定吸光度(OD)值的变化。规定 1 min 内 OD_{290} 变化 0.01 为 PAL 的 1 个活力单位($\mu\text{mol}/\text{min}$),计算公式见式(1):

$$\text{PAL 活力}/(\mu\text{mol}/\text{min}) = \frac{\Delta OD_{290} \times V_T}{m \times V_s \times 0.01 \times t} \quad (1)$$

式中, ΔOD_{290} 为反应时间内吸光度的变化值; m 为菌丝总质量(g); V_T 为提取酶液总体积(mL); V_s 为测定时取用酶液体积(mL)。

1.2.2 过氧化物酶(POD)活力测定

1.2.2.1 样品制备 同 1.2.1.1 节。

1.2.2.2 酶液提取 操作方法同 1.2.1.2 节,只是以 10 mL 0.1 mol/L、pH 5.5 的磷酸缓冲液(含 1×10^{-3} mol/L 的 EDTA, 20×10^{-3} mol/L 的 β -巯基乙醇)代替硼酸缓冲液。

1.2.2.3 酶活力测定 按李合生^[24]的方法,经多次预备试验确定酶反应体系为:2.0 mL 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液(pH 5.8),1 mL 质量分数为 3% 的双氧水,1 mL 0.05 mol/L 的愈创木酚及 1.0 mL 酶液。在 37 °C 水浴反应 15 min 后迅速转入冰浴中,对照以缓冲液代替酶液。用紫外分光光度计在 470 nm 处测定反应 3 min 时的 OD 值。每隔 30 s 记录 1 次,共记 6 次,以每 1 min 内 OD_{470} 变化 0.01 为 1 个酶活力单位($\mu\text{mol}/\text{min}$),计算公式见式(2):

$$\text{POD 活力}/(\mu\text{mol}/\text{min}) = \frac{\Delta OD_{470} \times V_T}{m \times V_s \times 0.01 \times t} \quad (2)$$

式中, ΔOD_{470} 为反应时间内吸光度的变化值; m 为菌丝总质量(g); t 为反应时间; V_T 为提取酶液总体积(mL); V_s 为测定时取用酶液体积(mL)。

1.2.3 菌株对渗透压的敏感性测定 参照陈夕军等^[25]报道的方法并略有改进。供试菌株于 PDA 平板上、28 °C 培养 7 d 后,从菌落边缘打取直径 7 mm 的菌饼,分别接种于含氯化钠质量浓度为 0、20、40、80 g/L 的 PDA 培养基平板上,于 28 °C 恒温条件下

培养 6 d,以交叉法^[26]测量菌落直径。每处理重复 4 次。

1.2.4 药剂对菌株细胞膜透性的影响 参照石志琦等^[19]报道的方法并略有改进。将供试菌株于 PDA 平板上、28 °C 下培养 5 d 后,制成直径 7 mm 的菌碟,分别接入 PDA 平板中央,28 °C 培养 7 d。刮取新鲜菌丝,用重蒸水冲洗,真空抽滤近干后称取鲜菌丝 2.0 g 放入三角瓶中,分别加入质量浓度为 0、0.1、1.0、10.0、50.0、100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的戊唑醇药液,于 28 °C 恒温水浴中振荡(120 r/min)培养不同时间后,用 DDS-11A 型电导仪分别测定药剂处理 0、10、20、30 min 及 1、1.5、2、3、4、5、6、7、9 h 时的电导率。以菌丝加重蒸水为对照。最后煮沸(死处理),测定电导率。每个处理重复 3 次。按照(3)式计算相对渗率。

$$\text{相对渗率}/\% = \frac{G_t - G_0}{G_{\text{死处理}}} \times 100 \quad (3)$$

式中: G_t 为某一时刻的电导率值; G_0 为最初(0 min)时的电导率值; $G_{\text{死处理}}$ 为死处理后的电导率值。

1.2.5 敏感及抗性菌株中可溶性蛋白含量测定

采用考马斯亮蓝 G-250 法^[27]。

1.2.6 敏感及抗性菌株酯酶同工酶电泳 参照李清铎等^[28]的方法,但略有改进。

1.2.6.1 样品制备 分别取冻干菌丝 2.0 g,置于预冷的研钵内,加入液氮、石英砂和 1 g PVP,在冰浴中研磨、匀浆,加入 10 mL 蒸馏水,混匀。将匀浆液转入塑料离心管中,平衡后于 8 000 r/min、4 °C 下离心 15 min,上清液即为酶液,置冰浴中待用。

1.2.6.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳 配制质量分数分别为 7% 的分离胶和 3% 的浓缩胶。吸取 16 μL 酶液,与 4 μL Buffer 混匀后分别注入点样孔,于 4 °C 下进行恒压电泳(电压 140 V,电泳时间 8 h 左右)。每个样品重复 3 次。

1.2.6.3 染色

1.2.6.3.1 染色液配制 将 0.2 g 固蓝 B 盐溶于 200 mL 0.2 mol/L、pH 6.5 的磷酸缓冲液中并过滤;称取 0.1 g α -醋酸萘酯和 0.1 g β -醋酸萘酯,以少量丙酮溶解后缓慢滴入滤液中,即为染色液。

1.2.6.3.2 染色及脱色 当溴酚兰指示剂距前端 1 cm 时,停止电泳,剥胶后在清水中漂洗,于染色液中染色至显清酶带后,置于质量分数为 7% 的醋酸中保存并拍照。

1.2.6.4 迁移率计算 凝胶染色后测定溴酚蓝与各酶带在分离胶中的迁移距离,按(4)式计算迁移

率(R_f)。

$$R_f = \frac{\text{酶带迁移距离}}{\text{溴酚蓝迁移距离}} \quad (4)$$

1.3 数据处理

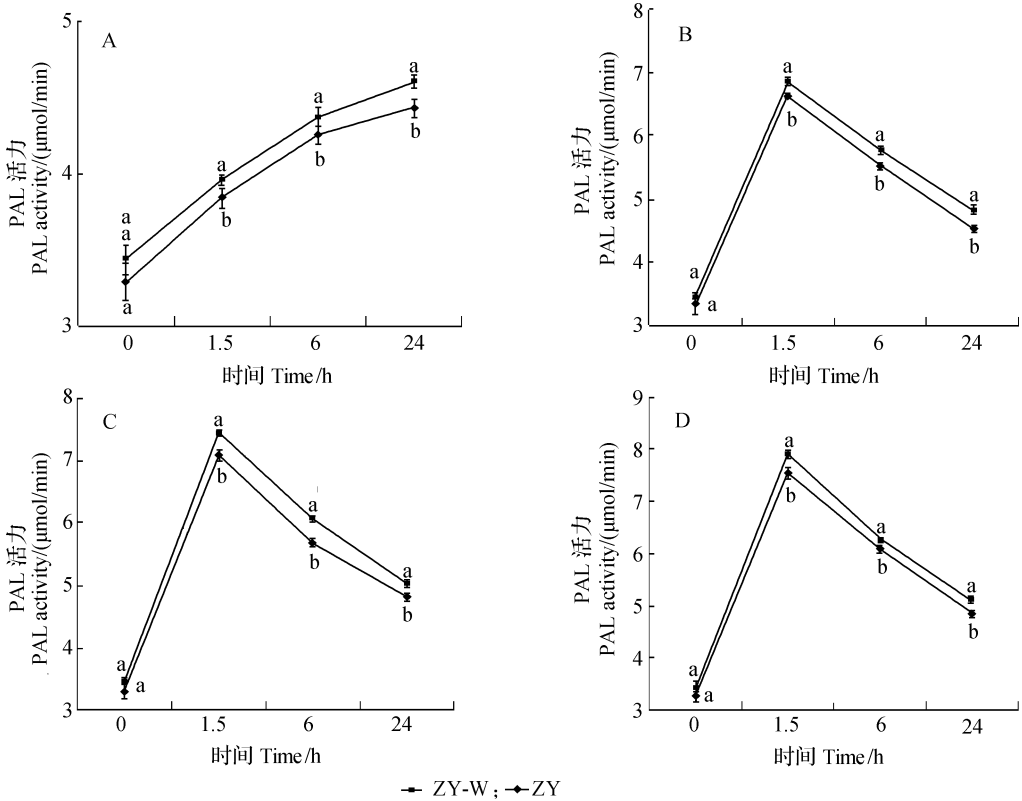
试验结果采用 SPSS13.0 统计软件进行处理,利用 Duncan 氏新复极差检验法分析差异显著性。

2 结果与分析

2.1 ZY-W 和 ZY 菌株的 PAL 活力

经不同浓度戊唑醇处理后,ZY-W 和 ZY 菌株体内 PAL 活力随时间的变化情况见图 1。在相同处理时间内,2 菌株体内的 PAL 活力均随着药剂处

理浓度的升高而逐渐上升,各浓度下的 PAL 活力均高于空白对照。经 1、5 和 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的戊唑醇处理后,ZY 与 ZY-W 的 PAL 活力均在 1.5 h 内迅速升高至最高值,分别为 0 h 时的 2.0 ~ 2.3 倍,且随着药剂浓度的升高,酶活力逐渐增大。以 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的药液处理 1.5 h 后,2 菌株体内的 PAL 活力均达到最高,且均为起始值的 2.3 倍;处理后 1.5 ~ 24 h,2 菌株的 PAL 活力均随着时间的推移有所下降,但仍高于起始值。试验中还发现,在无药(0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)条件下,0 ~ 24 h 期间 ZY 和 ZY-W 菌株体内的 PAL 活力一直处于缓慢上升状态,最高值均为起始时的 1.3 倍,表明在清水处理的无营养状态下,PAL 活力



A. 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; B. 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; C. 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; D. 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$

图 1 不同浓度戊唑醇处理不同时间后 ZY-W 和 ZY 菌株体内 PAL 活力

Fig. 1 Comparison of PAL activity between ZY-W and ZY after treated by different content of fungicide and different time

注:图中数据经 Duncan 氏新复极差检验,不同字母表示在 0.05 水平差异显著。

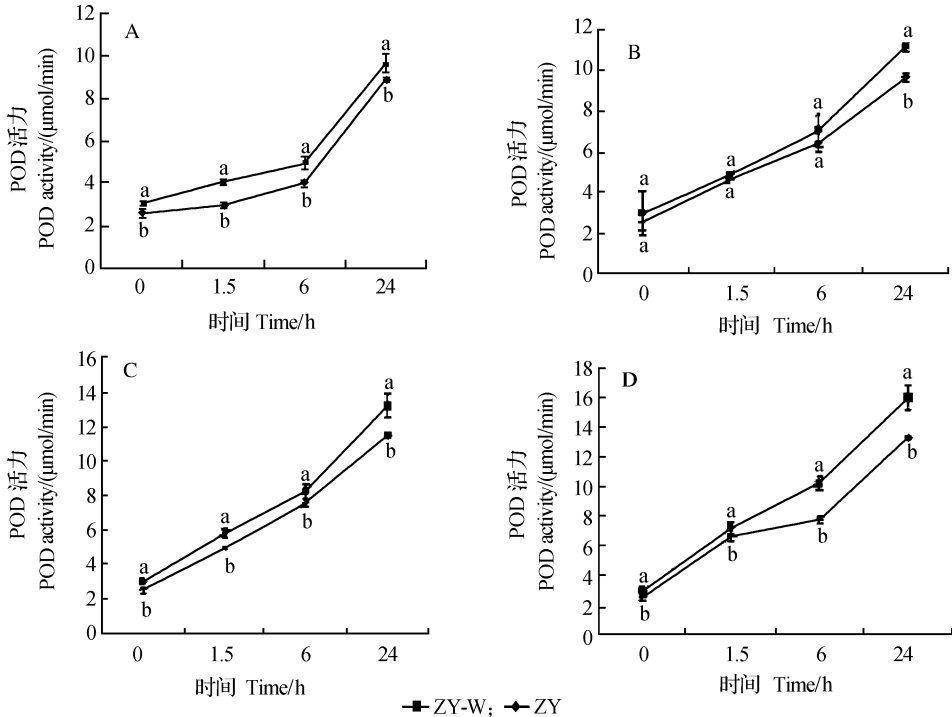
Note: Data in the figure were tested by Duncan's multiple range test, data in the same row followed by the different letters indicated significant difference at 0.05 level.

也会逐渐上升。

2.2 ZY-W 和 ZY 菌株的 POD 活力

经不同浓度戊唑醇处理后,2 菌株体内 POD 活力随时间的变化情况见图 2。在不同浓度药剂处理及无药条件下,ZY 和 ZY-W 的 POD 活力均随着时间的推移不断升高,24 h 内其活力分别升高至起始值

的 1.2 ~ 5.2 倍和 1.4 ~ 5.3 倍;且各浓度药剂处理组 POD 活力均明显高于无药对照;在相同药剂浓度及无药条件下,ZY-W 的 POD 活力均明显高于 ZY ($P < 0.05$)。表明草莓枯萎病菌在遇到外界逆境(如药剂、无营养等)胁迫时,其体内 POD 活力会升高,且抗性菌株的抗逆能力较敏感菌株高。



A. 0 $\mu\text{g/mL}$; B. 1 $\mu\text{g/mL}$; C. 5 $\mu\text{g/mL}$; D. 25 $\mu\text{g/mL}$

图 2 不同浓度戊唑醇处理不同时间后 ZY-W 和 ZY 菌株体内 POD 活力比较

Fig. 2 Comparison of POD activity between ZY-W and ZY after treated by different content of fungicide and different time

注:图中数据经 Duncan 氏新复极差检验,不同字母表示在 0.05 水平差异显著。

Note: Data in the figure were tested by Duncan's multiple range test, data in the same row followed by the different letters indicated significant difference at 0.05 level.

2.3 ZY-W 和 ZY 菌株对渗透压的敏感性比较

在氯化钠质量浓度从 0 增加至 20 g/L 时, ZY 的菌落直径略有增大(75.0 ~ 80.0 mm), 表明低浓度的氯化钠对 ZY 的菌落生长略有刺激作用, 但 ZY-W 的菌落直径变化不大(66.6 ~ 66.5 mm); 当氯化钠质量浓度 > 20 g/L 时, ZY 和 ZY-W 的菌落直径均变小, 分别为 56.5 ~ 34.2 mm 和 38.1 ~ 16.6 mm, 且前者均显著大于后者($P < 0.05$), 表明高浓度的氯化钠对 2 菌株的菌落生长均有抑制作用, 且抗性菌株对渗透压表现更为敏感(图 3)。

2.4 戊唑醇对 2 菌株细胞膜透性的影响

结果见图 4。经不同浓度戊唑醇处理后, ZY 的相对渗率均高于 ZY-W ($P < 0.05$), 且随着处理时间的延长两者之间的差距增大; 至 9 h 时, 各浓度处理组 ZY 的相对渗率分别为 ZY-W 的 1.6、1.9、2.4、2.3、1.6 和 1.5 倍。表明敏感菌株比抗性菌株渗出的电解质更多。

2.5 ZY 和 ZY-W 菌株体内可溶性蛋白含量比较

经可溶性蛋白标准曲线转换, 2 菌株体内可溶性蛋白含量如图 5 所示, ZY-W 菌株的可溶性蛋白

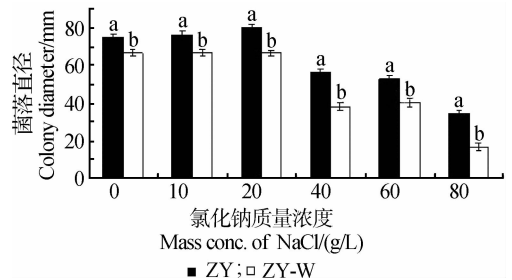


图 3 培养基中不同氯化钠质量浓度对菌株菌落直径的影响

Fig. 3 Effect of different concentrations of NaCl in medium on colony diameter

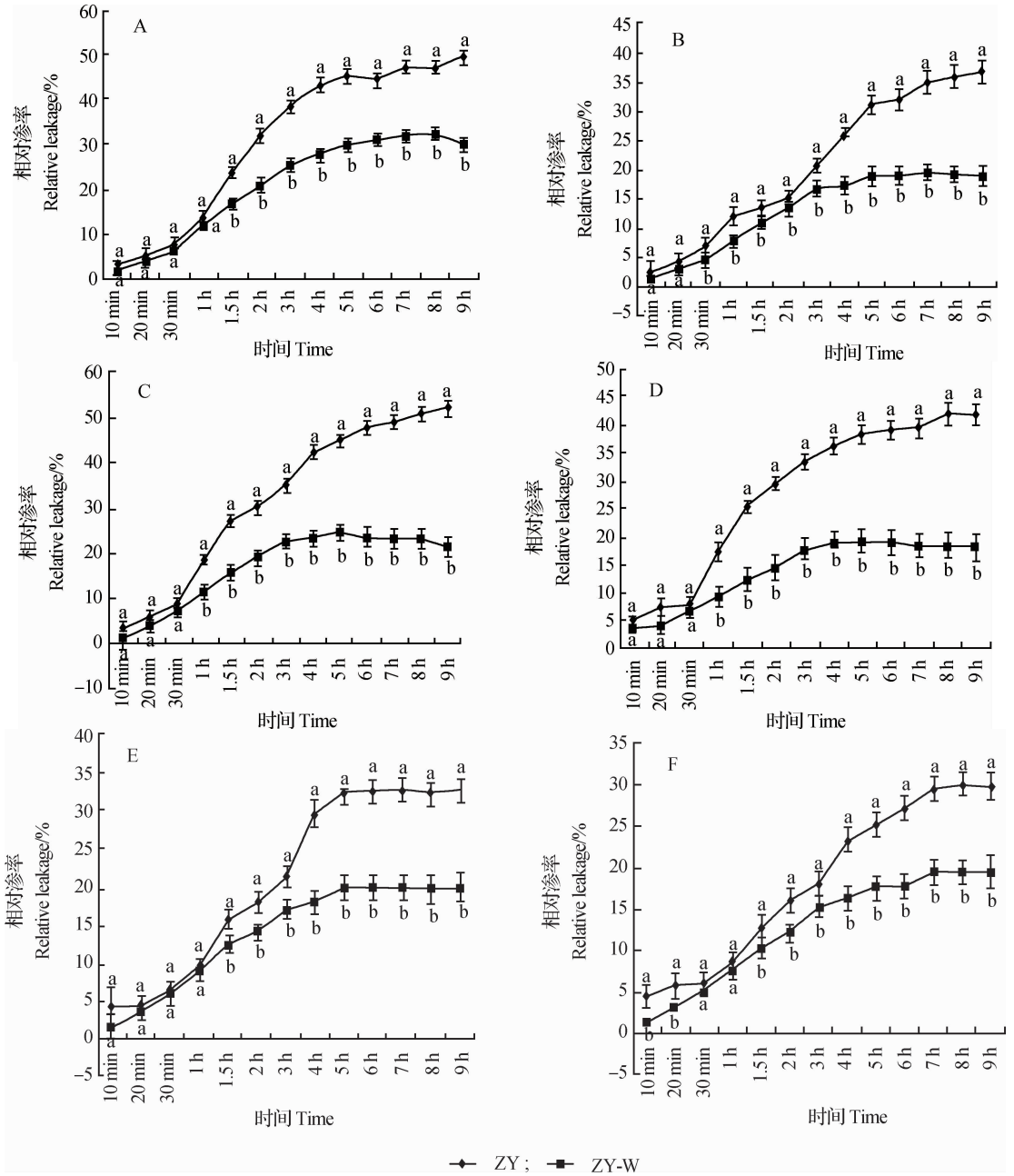
注:图中数据经 Duncan 氏新复极差检验,不同字母表示在 0.05 水平差异显著。

Note: Data in the figure were tested by Duncan's multiple range test, data in the same row followed by the different letters indicated significant difference at 0.05 level.

含量是 ZY 的 1.2 倍, 两者间差异显著 ($P < 0.05$)。抗药性菌株体内可溶性蛋白含量的提高, 可能也是其抗逆性增强的原因之一。

2.6 ZY 和 ZY-W 菌株酯酶同工酶电泳图谱分析

ZY-W 与 ZY 的酯酶同工酶电泳图谱存在着特



A. 0 mg/L; B. 0.1 mg/L; C. 1 mg/L; D. 10 mg/L; E. 50 mg/L; F. 100 mg/L.

图4 不同浓度戊唑醇处理后敏感和抗性菌株的相对渗率变化

Fig. 4 The change of relative leakage in different concentrations of fungicides between tebuconazole-resistant and sensitive strains in different times

注:图中数据经 Duncan 氏新复极差检验,不同字母表示在 0.05 水平差异显著。

Note: Data in the figure were tested by Duncan's multiple range test, data in the same row followed by the different letters indicated significant difference at 0.05 level.

异性差异(图 6)。其中 ZY 菌株有 2 条酶带,分别标记为 1 和 2,其 R_f 值分别为 0.18 和 0.21; ZY-W 菌株除含有上述 2 条酶带外,还有 1 条颜色较深的酶带,标记为 3,其 R_f 值为 0.24,应为 ZY-W 菌株的特征性谱带。

3 讨论

PAL 和 POD 是生物体内普遍存在且活性较高的 2 种抗逆酶^[29],当生物体遭遇逆境时即表现为酶活力的增加^[30]。其中 PAL 通过催化 L-苯丙氨酸脱氨形成反式肉桂酸而进入苯丙烷类代谢途径,生成

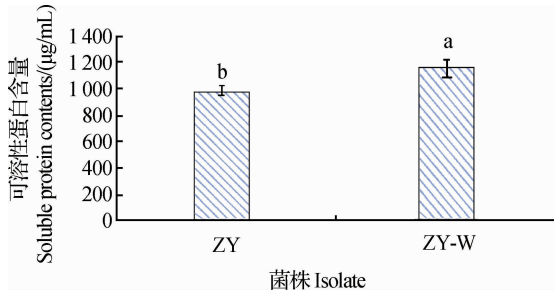
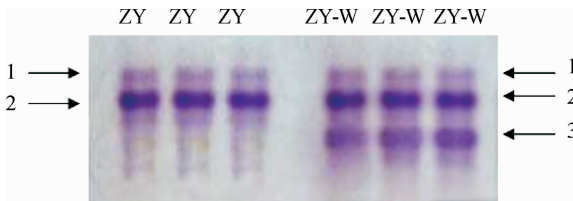


图5 敏感及抗性菌株体内可溶性蛋白含量比较

Fig. 5 Comparison of soluble protein between tebuconazole-resistant and sensitive isolates

注:图中数据经 Duncan 氏新复极差检验,不同字母表示在 0.05 水平差异显著。

Note: Data in the figure were tested by Duncan's multiple range test, data in the same row followed by the different letters indicated significant difference at 0.05 level.



1. $R_f = 0.18$; 2. $R_f = 0.21$; 3. $R_f = 0.24$

图6 敏感及抗性菌株酯酶同工酶电泳图谱

Fig. 6 Electrophoretic patterns of esterases of tebuconazole-resistant and sensitive isolates of *F. oxysporum*

类黄酮、木质素等多种次生代谢产物^[31-32]。石志琦等^[19]发现,抗性菌株中的 PAL 活力始终高于敏感菌株,认为逆境条件(如营养不良、杀菌剂胁迫等)可诱导病原菌体内 PAL 活力升高。本研究也发现,草莓枯萎病菌抗戊唑醇菌株和敏感菌株体内的 PAL 活力均随着药剂处理浓度的升高和处理时间的延长而呈现上升趋势,且抗性菌株的 PAL 活力均高于敏感菌株,表明 PAL 活力与草莓枯萎病菌对戊唑醇的抗性有关。POD 与呼吸作用及生长素的氧化密切相关,其活力可反映某一时期生物体内的氧化代谢变化^[33]。夏晓明^[15]报道,对于同一菌株,POD 活力与药剂处理浓度呈正相关性,而在同一药剂浓度下,POD 活力与菌株的抗性水平也呈正相关性。本研究结果与之相似,表明草莓枯萎病菌对戊唑醇的抗性与其体内防御酶活力的增强有关。

病原菌产生抗药性后,其细胞膜透性会发生变化,并伴随抗逆性的变化。丁中等^[18]认为可利用电导率法对抗性和敏感菌株进行鉴定;石志琦等^[19]和

张永杰等^[34]分别测定了核盘菌抗菌核净突变菌株及灰霉病菌高抗腐霉利菌株的电导率,并将其与敏感菌株进行了比较,发现抗性菌株均能够在较短的时间里渗出更多的电解质;夏晓明等^[35]则发现,对戊唑醇具有抗性的禾谷丝核菌菌株,其细胞膜的透性要相对低于敏感菌株。本研究中经不同浓度的戊唑醇处理不同时间后,抗性菌株 ZY-W 的相对渗率也均低于敏感菌株 ZY,表明抗性菌株细胞膜的透性低于敏感菌株;在不同质量浓度(0~100 mg/L)戊唑醇处理下,2 菌株的相对渗率均随着时间的延长表现为逐渐上升的趋势,上升速度存在着“慢-快-慢”的规律。草莓枯萎病菌细胞膜透性的改变可能是其对戊唑醇产生抗性的主要生理机制之一。

酯酶同工酶电泳是进行真菌分类、抗药性菌株检测及抗性机理研究的有效手段^[20-21]。李新风^[36]研究发现,在核盘菌的酯酶同工酶电泳图谱中, $R_f = 0.22$ 的主酶带是抗性菌株中稳定存在而敏感菌株所缺少的,认为该酶带与核盘菌的抗药性有关。本研究发现,在酯酶同工酶电泳图谱中,抗性菌株 ZY-W 比敏感菌株 ZY 多了 1 条酶带,该 $R_f = 0.24$ 的主酶带为戊唑醇抗性菌株的特征性谱带,推测该谱带与抗药性可能存在相关性。此外,抗戊唑醇菌株 ZY-W 体内的可溶性蛋白含量显著高于敏感菌株 ZY,表明菌株抗药性的产生可能还与其体内可溶性蛋白含量的提高有关。总之,与敏感菌株 ZY 相比,抗戊唑醇菌株 ZY-W 的生理生化特性发生了显著的变化,但其准确的抗性机制还需进一步深入研究。

参考文献(Reference):

- [1] 顾春波,史晓斌,姜莉莉,等. 草莓枯萎病菌对多菌灵的抗性及其抗性菌株生物学特性[J]. 植物保护学报,2010,37(3): 266-272.
GU Chunbo, SHI Xiaobin, JIANG Lili, et al. Resistance of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* to carbendazim and the biological characters of carbendazim-resistant strain [J]. *Acta Phytophylacica Sinica*, 2010, 37(3): 266-272. (in Chinese)
- [2] 杨焕青,王开运,范昆,等. 草莓枯萎病菌的生物学特性及 7 种杀菌剂对其抑制作用[J]. 植物保护学报,2008,35(2):169-174.
YANG Huanqing, WANG Kaiyun, FAN Kun, et al. Biological characteristics of strawberry *Fusarium* wilt and inhibitory effects of seven fungicides [J]. *Acta Phytophylacica Sinica*, 2008, 35(2):169-174. (in Chinese)
- [3] 曾富春,黄云,赵艳琴,等. 草莓枯萎病菌的生物学特性[J]. 四川农业大学学报,2006,24(2):156-160.
ZENG Fuchun, HUANG Yun, ZHAO Yanqin, et al. Biological characteristics of strawberry *Fusarium* wilt [J]. *J Sichuan Agric*

- Univ,2006,24(2):156-160. (in Chinese)
- [4] 郑莉,朱秋珍,冯自立,等. 草莓枯萎病病原菌鉴定及其生物学特性[J]. 湖北农业科学,2006,45(2):194-195.
ZHENG Li, ZHU Qiuzhen, FENG Zili, *et al.* Identity and biological characteristics of strawberry *Fusarium wilt*[J]. *J Hubei Agric Sci*,2006,45(2):194-195. (in Chinese)
- [5] 姜莉莉,顾春波,左一鸣,等. 草莓枯萎病菌抗多菌灵突变体 ZY-R 的生理生化特性研究[J]. 农药学学报,2011,13(2):138-143.
JIANG Lili, GU Chunbo, ZUO Yiming, *et al.* Study on physiological and biochemical characteristics of carbendazim-resistant isolate of *Fusarium oxysprum* f. sp. *fragariae* ZY-R[J]. *Chin J Pestic Sci*,2011,13(2):138-143. (in Chinese)
- [6] 刘英华,王开运,姜兴印,等. 禾谷丝核菌对戊唑醇的抗性及其抗性菌系生物学特性[J]. 植物保护学报,2003,30(4):424-428.
LIU Yinghua, WANG Kaiyun, JIANG Xingyin, *et al.* Resistance of *Rhizoctonia cerealis* to tebuconazole and the biological characters of tebuconazole-resistant strains [J]. *Acta Phytophylacica Sinica*,2003,30(4):424-428. (in Chinese)
- [7] HOLB I J, SCHNABEL G. Differential effect of triazoles on mycelial growth and disease measurements of *Monilinia fructicola* isolates with reduced sensitivity to DMI fungicides [J]. *Crop Prot*,2007,(26):753-759.
- [8] GOLEMBIEVSKI R C, VARGAS J R, JONES A L, *et al.* Detection of demethylation inhibitor (DMI) resistance in *Sclerotinia homeocarpa* populations [J]. *Plant Dis*, 1995, 79: 491-493.
- [9] 王汉城,周明国,张艳军,等. 戊唑醇对立枯丝核菌的抑制作用及在水稻上的应用[J]. 农药学学报,2007,9(4):357-362.
WANG Hancheng, ZHOU Mingguo, ZHANG Yanjun, *et al.* Fungicidal activity of tebuconazole against *Rhizoctonia solani* and its application to rice[J]. *Chin J Pestic Sci*,2007,9(4):357-362. (in Chinese)
- [10] 胡燕,王怀训,夏晓明,等. 四地区小麦纹枯病菌对6种杀菌剂的抗性比较[J]. 植物保护学报,2006,33(4):55-60.
HU Yan, WANG Huaixun, XIA Xiaoming, *et al.* Susceptibility of *Rhizoctonia cerealis* to six fungicides in four wheat areas [J]. *Acta Phytophylacica Sinica*,2006,33(4):55-60. (in Chinese)
- [11] LEROUX P, CHAPELAND F, DESBROSSES D, *et al.* Patterns of cross-resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards [J]. *Crop Prot*, 1999,18(10):687-697.
- [12] ROBBERTSE B, VAN DER RIJST M, VAN AARDE I M R, *et al.* DMI sensitivity and cross-resistance patterns of *Rhynchosporium secalis* isolates from South Africa [J]. *Crop Prot*, 2001,20(2):97-102.
- [13] MA Z H, MORGAN D P, FELTS D, *et al.* Sensitivity of *Botryosphaeria dothidea* from California pistachio to tebuconazole[J]. *Crop Prot*, 2002,21(9):829-835.
- [14] 顾春波,姜莉莉,王开运,等. 抗戊唑醇草莓枯萎病菌 ZY-W 的诱导及其生物学特性[J]. 中国农业科学,2010,43(14):2897-2904.
GU Chunbo, JIANG Lili, WANG Kaiyun, *et al.* Induction and characteristics of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* ZY-W resistant to tebuconazole [J]. *Sci Agric Sin*, 2010, 43(14): 2897-2904. (in Chinese)
- [15] 夏晓明. 禾谷丝核菌对戊唑醇的抗性机制研究[D]. 泰安:山东农业大学,2006.
XIA Xiaoming. Studies on the resistance mechanism of *Rhizoctonia cerealis* to tebuconazole [D]. Tai'an: Shandong Agricultural University,2006. (in Chinese)
- [16] HAMID M, KHALIL R. Potential application of peroxidases[J]. *Food Chem*, 2009,115(4):1177-1186.
- [17] 张小青,曹军卫,翟超,等. 枯草芽孢杆菌渗透压调节基因 *proB* 的克隆和表达[J]. 微生物学报,2002,42(2):163-168.
ZHANG Xiaoqing, CAO Junwei, ZHAI Chao, *et al.* Cloning and expression of a osmoregulatory gene *proB* from halotolerant *Bacillus subtilis* [J]. *Acta Microbiologica Sinica*,2002,42(2):163-168. (in Chinese)
- [18] 丁中,刘峰,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]. 农药学学报,2003,5(3):94-96.
DING Zhong, LIU Feng, MU Liyi. A preliminary study on detecting resistance of *Botrytis cinerea* to carbendazim with conductometer[J]. *Chin J Pestic Sci*,2003,5(3):94-96. (in Chinese)
- [19] 石志琦,周明国,叶钟音. 核盘菌对菌核净的抗药性机制初探[J]. 农药学学报,2000,2(2):47-51.
SHI Zhiqi, ZHOU Mingguo, YE Zhongyin. Study on resistance mechanism of *Sclerotinia sclerotiorum* to dimethachlon [J]. *Chin J Pestic Sci*,2000,2(2):47-51. (in Chinese)
- [20] 赵小明,吕金殿,高鸿生,等. 大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)酯酶同工酶的测定[J]. 河北农业大学学报,1997,20(1):37-44.
ZHAO Xiaoming, LÜ Jindian, SHANG Hongsheng, *et al.* Determination of esterase isoentymes from isolates of *Verticillium dahliae* [J]. *J Hebei Agric Univ*, 1997, 20(1): 37-44. (in Chinese)
- [21] 魏艳敏,周与良. 红酵母属同工酶酶谱分析及其分类研究[J]. 菌物系统,1998,17(1):63-67.
WEI Yanmin, ZHOU Yuliang. A taxonomic study of *Rhodotorula* based on isoenzyme patterns [J]. *Mycosystema*, 1998, 17(1): 63-67. (in Chinese)
- [22] BOOTH C. The Genus *Fusarium* [M]. Commonwealth Mycological Institute, England; Kew Surrey, 1971:114-121.
- [23] 徐存忠,杨信东. 植物病原真菌学[M]. 吉林:吉林农大出版社,1984:149-152.
XU Cunzhong, YANG Xindong. Plant Pathogenic Fungi [M]. Jilin: Jilin Agricultural University Press, 1984: 149-152. (in Chinese)
- [24] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社,2000:164-165,213-214.
LI Hesheng. Experimental Principle and Technology of Plant Physiology and Biochemistry [M]. Beijing: Higher Education Press,2000:164-165,213-214. (in Chinese)
- [25] 陈夕军,曹敏娟,孔维文,等. 油菜菌核病菌抗腐霉利菌株的生

- 理生化特性及抗药机制初步分析[J]. 中国油料作物学报, 2010, 32(4): 534 - 539.
- CHEN Xijun, CAO Minjuan, KONG Weiwen, *et al.* Physiological and biochemical features of rocymidone-resistant mutants to *Sclerotinia sclerotiorum* and preliminary study of resistance mechanism[J]. *Chin J Oil Crop Sci*, 2010, 32(4): 534 - 539. (in Chinese)
- [26] 黄国洋. 农药试验技术与评价方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 12 - 15.
- HUANG Guoyang. Test Technology and Evaluate Method of Pesticide[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2000: 12 - 15. (in Chinese)
- [27] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantiation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dyeing binding[J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248 - 254.
- [28] 李清铤, 朱华, 王彰明. 江苏麦类禾谷镰刀菌酯酶同工酶的测定[J]. 植物病理学报, 1985, 15(4): 217 - 223.
- LI Qingxian, ZHU Hua, WANG Zhangming. Determination of esterase isoenzymes of *Fusarium graminearum* Schw. in Jiangsu [J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 1985, 15(4): 217 - 223. (in Chinese)
- [29] 申宏波, 文景芝, 马成云, 等. Harpins 蛋白防治黄瓜霜霉病机理研究: 黄瓜接种 Harpins 蛋白后 PAL 酶活性的变化[J]. 中国农学通报, 2005, 21(12): 330 - 332.
- SHEN Hongbo, WEN Jingzhi, MA Chengyun, *et al.* The research of the mechanism that using Harpins protein to prevent and cure cucumber frost mildewed disease; the activity variety of PAL enzyme after inoculating Harpins protein [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2005, 21(12): 330 - 332. (in Chinese)
- [30] 张丽, 常金华, 罗耀武. 不同高粱基因型感蚜虫前后 POD、PPO、PAL 酶活性变化分析[J]. 农业生物技术科学, 2005, 21(7): 40 - 42, 198.
- ZHANG Li, CHANG Jinhua, LUO Yaowu. Activity changes of POD, PPO, PAL of the different sorghum genotypes invaded by *Aphis sacchari*. Zehntner [J]. *Sci Agric Biotech*, 2005, 21(7): 40 - 42, 198. (in Chinese)
- [31] 曹锦萍, 吕培涛, 程桂平, 等. 部分观赏植物苯丙氨酸解氨酶的初步研究[J]. 仲恺农业工程学院学报, 2009, 22(4): 14 - 18.
- CAO Jinping, LÜ Peitao, CHENG Guiping, *et al.* A primary study on phenylalanine ammonia lyase in some ornamental plants[J]. *J Zhongkai Univ Agric & Eng*, 2009, 22(4): 14 - 18. (in Chinese)
- [32] 徐晓梅, 杨曙光. 苯丙氨酸解氨酶研究进展[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(31): 15115 - 15119, 15122.
- XU Xiaomei, YANG Shuguang. Advances in the studies of phenylalanine ammonia lyase [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2009, 37(31): 15115 - 15119, 15122. (in Chinese)
- [33] 邢会琴, 李敏权, 徐秉良, 等. 过氧化物酶和苯丙氨酸解氨酶与苜蓿白粉病抗性的关系[J]. 草地学报, 2007, 15(4): 376 - 380.
- XING Huiqin, LI Minquan, XU Bingliang, *et al.* Relationships between leaf POD and PAL and the resistance of alfalfa cultivars against powdery mildew[J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2007, 15(4): 376 - 380. (in Chinese)
- [34] 张永杰, 高俊明, 韩巨才, 等. 抗速克灵灰霉病菌菌株电导率变化及对渗透压的敏感性[J]. 山西农业大学学报: 自然科学版, 2004, 24(1): 34 - 36.
- ZHANG Yongjie, GAO Junming, HAN Jucai, *et al.* Osmolarity sensitivity and relative conductivity of procymidone-resistant strains of *Botrytis cinerea* Pers [J]. *J Shanxi Agric Univ; Nat Sci Ed*, 2004, 24(1): 34 - 36. (in Chinese)
- [35] 夏晓明, 王开运, 范昆, 等. 抗戊唑醇禾谷丝核菌的渗透压敏感性及其相对渗透率变化研究[J]. 农药学报, 2005, 7(2): 126 - 130.
- XIA Xiaoming, WANG Kaiyun, FAN Kun, *et al.* Changes of relative leakage and osmolarity sensitivity to tebuconazole-resistant strains of *Rhizoctonia cerealis* [J]. *Chin J Pestic Sci*, 2005, 7(2): 126 - 130. (in Chinese)
- [36] 李新风. 向日葵菌核病菌对常用杀菌剂的敏感性及其抗性突体的生理生化特性研究[D]. 太原: 山西农业大学, 2003.
- LI Xinfeng. The sensitivity of *Sclerotinia sclerotiorum* to commonly used fungicides and physiological and biochemical characteristics of the resistant mutants [D]. Taiyuan: Shanxi Agricultural University, 2003. (in Chinese)

(责任编辑: 唐 静)

· 简讯 ·

2011 年我国农药产量情况

2011 年我国农药原药产量为 264.87 万吨(折百量), 比上年同期增长 13.1%, 增速远远高于 2010 年。其中杀虫剂原药产量为 70.9 万吨, 占我国农药总产量的 31.8%, 较上年同期减少 4.8%; 除草剂产量为 117.5 万吨, 占 45%, 比上年同期增长 11.5%; 杀菌剂产量为 15.0 万吨, 占 7.1%, 比上年同期减少 10.2%; 其他农药产量 61.47 万吨, 占 16.1%。