

·研究简报·

甲霜灵对烟草黑胥病菌细胞膜透性的影响

许学明^{1, 2}, 王开运^{*1}, 段海明¹, 林才华¹, 张文成¹

(1. 山东农业大学 植物保护学院, 山东 泰安 271018; 2 连云港职业技术学院, 江苏 连云港 222006)

摘要:为阐明烟草黑胥病菌抗甲霜灵的生理机制,研究了不同浓度甲霜灵处理 540 min 内敏感、低抗和高抗菌株相对渗率的变化情况,结果表明:甲霜灵能损害烟草黑胥病菌的细胞膜,使膜透性不断增大;其对敏感菌株 ZC002 和低抗菌株 10M-006 细胞膜透性的影响速度和程度比较接近,都随处理浓度 (0.1 ~ 100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的提高而不断增加;对高抗菌株 10M-004 细胞膜透性的影响速度最慢,程度最低,且随处理浓度 (50.0 ~ 100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的提高而增加。高抗菌株适应甲霜灵的能力明显强于敏感菌株和低抗菌株,该适应能力随甲霜灵浓度的提高而减弱。

关键词:甲霜灵;烟草黑胥病菌;细胞膜透性;相对渗率

中图分类号: S481.4

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2007)03-0301-04

Effect of Metalaxyl on Membrane Permeability of *Phytophthora nicotianae* var. *nicotianae*

XU Xue-ming^{1,2}, WANG Kai-yun^{*1}, DUAN Hai-ming¹, LIN Cai-hua¹, ZHANG Wen-cheng¹

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

2 Lianyungang Technical College, Lianyungang 222006, Jiangsu Province, China)

Abstract: In order to clarify the physiological mechanism of the resistance to metalaxyl of *Phytophthora nicotianae* var. *nicotianae*, the changes of the relative leakage of sensitive, lower-resistant and higher-resistant strains treated with metalaxyl at different concentrations within 540 minutes were studied. The results showed that metalaxyl might damage the membrane of *P. nicotianae* var. *nicotianae*, whose permeability increased after metalaxyl treatment; the speed and degree of metalaxyl effect on the membrane permeability of the sensitive strain, ZC002 were similar to those of the lower-resistant strain, 10M-006, which increased when metalaxyl concentration (0.1 ~ 100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) increased; those of the higher-resistant strain, 10M-004 were lowest, which increased when metalaxyl concentration (50.0 ~ 100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) increased. 10M-004 had stronger ability to adapt to metalaxyl than ZC002 and 10M-006 had, which decreased when metalaxyl concentration increased.

Key words: metalaxyl; *Phytophthora nicotianae* var. *nicotianae*; membrane permeability; relative leakage

病原菌细胞膜透性的改变,可导致杀菌剂不能进入病原菌体内或被病菌高速排出菌体,从而

表现为病原菌抗药能力增强^[1]。细胞膜透性改变的程度可用电导率大小来衡量^[2-4],也可

收稿日期: 2007-05-08; 修回日期: 2007-07-16

作者简介: 许学明 (1963-), 男, 江苏滨海人, 高级农艺师, 连云港职业技术学院园艺系主任, 现为山东农业大学植物保护学院博士研究生;

*通讯作者 (Author for correspondence): 王开运 (1954-), 男, 山东滕州人, 教授, 博士生导师, 主要从事农药毒理及有害生物抗药性研究。

联系电话: 0538-8242345; E-mail: kywang@sdau.edu.cn

基金项目: 国家烟草专卖局重点项目 (国烟科 [2003] 579号)。

以用相对渗率^[5]来表示。本研究以烟草黑胫病菌抗甲霜灵菌株和敏感菌株为材料,比较了用不同浓度的甲霜灵处理后各菌株相对渗率的变化情况,首次明确了甲霜灵对烟草黑胫病菌细胞膜透性的影响及该影响在不同抗性菌株之间的差异,分析了烟草黑胫病菌抗甲霜灵的生理机制。

1 材料与方 法

1.1 供试菌株

敏感菌株(ZC002)采自山东省诸城市烟区典型病株,经分离纯化鉴定^[6]为烟草黑胫病菌 *Phytophthora nicotianae* var *nicotianae*,对甲霜灵敏感(EC_{50} 值为 $0.3173 \mu\text{g/mL}$)。10M-004和10M-006分别为甲霜灵室内筛选 ZC002 获得的高抗(EC_{50} 值为 $161.77 \mu\text{g/mL}$,抗性水平 509.8倍)和低抗(EC_{50} 值为 $4.4157 \mu\text{g/mL}$,抗性水平 13.9倍)菌株。

1.2 供试培养基

1.2.1 燕麦琼脂培养基 称取燕麦片 50 g,加入 1 000 mL 去离子水,在 60 ℃ 恒温水浴锅中加热 1 h 后,经 4 层纱布过滤去渣,滤液用去离子水定容至 1 000 mL。加入琼脂粉 18 g,在微波炉内加热至琼脂粉完全溶化后趁热分装,121 ℃ 下蒸汽湿热灭菌 30 min。

1.2.2 燕麦培养液 称取燕麦片 50 g,加入 1 000 mL 去离子水,在 60 ℃ 恒温水浴锅中加热 1 h 后,经 4 层纱布过滤去渣,滤液用去离子水定容到 1 000 mL。10 下于 5 000 r/min 下离心 5 min,收集上清液并分装,121 ℃ 下蒸汽湿热灭菌 30 min。

1.3 供试药剂和主要仪器

98% 甲霜灵(metalaxyl)原粉由山东海利尔药业有限公司提供。先用丙酮配成有效成分质量浓度为 1% 的母液,置 4 ℃ 冰箱中备用。

CR22型高速冷冻离心机(日本日立公司); DDS-11A型电导仪(上海雷磁仪器厂); HZQ-F160全恒温振荡培养箱(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司)。

1.4 不同浓度甲霜灵溶液的电导率测定

用重蒸水配制甲霜灵浓度分别为 0.1、1.0、10.0、50.0、100.0 $\mu\text{g/mL}$ 的药液 20 mL,于 100 mL 三角瓶中测定溶液的电导率。每浓度重

复 3 次。

1.5 甲霜灵对不同抗性菌株细胞膜透性的影响

参照夏晓明等^[5]的方法测定。将供试烟草黑胫病菌菌株分别于燕麦琼脂平板上、26 ℃ 下培养 4 d,制成 $\phi 7 \text{ mm}$ 菌饼,分别接入燕麦培养液中,于 26 ℃ 恒温振荡培养箱中振荡(120 r/min)培养 4 d后取菌丝备用。新鲜菌丝用重蒸水冲洗,真空抽滤后称取 1.0 g 放入 100 mL 三角瓶中,加入用重蒸水配制的浓度分别为 0.1、1.0、10.0、50.0、100.0 $\mu\text{g/mL}$ 的甲霜灵药液 20 mL,于 25 ℃ 的恒温水浴中保持振荡(120 r/min),分别测定 0(即刚放入菌丝)、5、10、15、30、60、90、120、180、240、300、360、420、480、540 min 及死处理(煮沸 30 min)时的电导率。每浓度重复 3 次,以重蒸水为对照。按(1)式计算相对渗率,再根据相对渗率比较细胞膜的透性。

$$\text{相对渗率}(\%) = \frac{C_t - C_0}{C_{\text{死处理}}} \times 100 \quad (1)$$

C_t :某一时刻的电导率; C_0 :最初(0 min)时的电导率; $C_{\text{死处理}}$:死处理后的电导率。

2 结果与分析

2.1 不同浓度甲霜灵溶液的电导率比较

测定结果(表 1)显示,在 0~100.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内,不同浓度甲霜灵溶液的电导率没有显著差异。因此,加入不同菌株的菌丝体后,不同浓度甲霜灵溶液之间的电导率差异及相对渗率的变化可归因于不同菌株之间细胞膜透性的差异及菌株与药剂相互作用所引起的细胞膜透性的改变。

2.2 甲霜灵对不同抗性菌株细胞膜透性影响的比较

测定结果(图 1~图 3)显示,对照条件下(不含甲霜灵),所有供试菌株相对渗率的变化比较一致,均为先急速上升,然后快速下降至 480 min 或 540 min 稳定下来。

处理条件下敏感菌株和低抗菌株相对渗率的变化见图 1、图 2,180 min 内的变化与对照基本一致,且变化曲线相互靠近;处理 180 min 后,相对渗率由下降先后转为上升,且甲霜灵处理浓度(10.0~100.0 $\mu\text{g/mL}$)越高,上升越早越快。相对渗率越高表明细胞膜透性越大,即甲霜灵对细胞膜损伤程度越大。

表 1 不同浓度甲霜灵溶液的电导率比较 (n=3)

Table 1 Comparison on conductivity of solutions between different metalaxyl concentrations (n=3)

| 浓度 Concentration /($\mu\text{g/mL}$) | 电导率 Conductivity / ($\mu\text{S/cm}$) | | |
|--|---|------------|---------------------------|
| | 范围 Range | 均值 Mean | 标准差 Standard deviation |
| 0.0 | 0.135 ~ 0.160 | 0.148 a | 0.012 6 |
| 0.1 | 0.140 ~ 0.170 | 0.155 a | 0.015 0 |
| 1.0 | 0.150 ~ 0.165 | 0.158 a | 0.007 6 |
| 10.0 | 0.150 ~ 0.175 | 0.158 a | 0.014 4 |
| 50.0 | 0.150 ~ 0.170 | 0.162 a | 0.010 4 |
| 100.0 | 0.145 ~ 0.165 | 0.167 a | 0.010 4 |

注:表中同一列数据后标相同小写字母者表示经 Duncan 氏新复极差测验,在 $P_{0.05}$ 水平上差异不显著。

Note: Data in a column followed by the same small letters are not significantly different at $P_{0.05}$ by Duncan's multiple range test

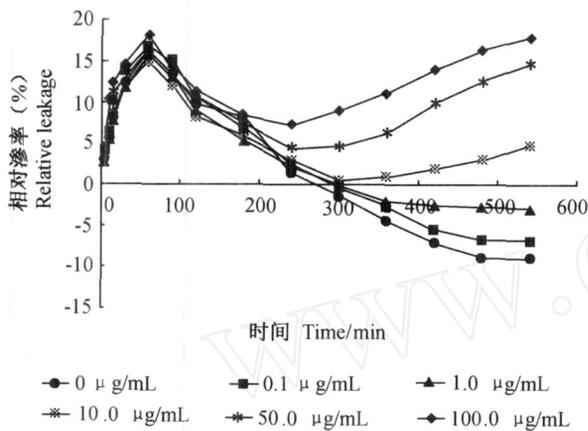


图 1 不同浓度甲霜灵处理后敏感菌株 (ZC002) 相对渗率的变化

Fig 1 Change of relative leakage of sensitive strain (ZC002) treated with different concentrations of metalaxyl

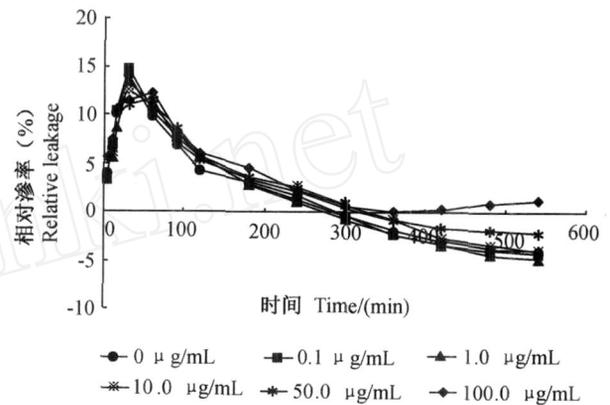


图 3 不同浓度甲霜灵处理后高抗菌株 (10M-004) 相对渗率的变化

Fig 3 Change of relative leakage of higher-resistant strain (10M-004) treated with different concentrations of metalaxyl

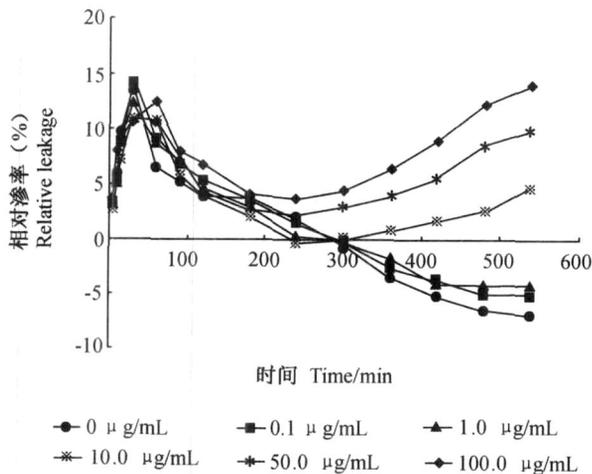


图 2 不同浓度甲霜灵处理后低抗菌株 (10M-006) 相对渗率的变化

Fig 2 Change of relative leakage of lower-resistant strain (10M-006) treated with different concentrations of metalaxyl

处理条件下高抗菌株相对渗率的变化见图 3。可见,除高浓度 (100.0 $\mu\text{g/mL}$) 处理 360 min 后相对渗率由下降转为上升外,其他处理相对渗率的变化情况与对照基本一致。

上述结果表明,甲霜灵能损害烟草黑胥病菌的细胞膜,使膜透性增大;对敏感菌株和低抗菌株细胞膜透性的影响速度和程度比较接近,均随处理浓度 (0.1 ~ 100.0 $\mu\text{g/mL}$) 的提高而增加,而对高抗菌株细胞膜透性的影响速度和程度最低。高抗菌株适应甲霜灵的能力明显强于敏感菌株和低抗菌株,该适应能力随甲霜灵浓度的提高而减弱。

3 讨论

刘洪斌等^[7]曾报道,甲霜灵对马铃薯晚疫病不同抗性水平菌株的细胞膜透性无明显影

响。但本研究发现,用较高浓度(10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和高浓度(50.0、100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)甲霜灵处理烟草黑胫病菌敏感、低抗菌株,以及用高浓度甲霜灵处理高抗菌株后,所有菌株细胞膜的透性均有所增大,最终(540 min)敏感菌株和低抗菌株的相对渗率明显高于高抗菌株,说明高抗菌株细胞膜受损伤的程度相对较小,其适应甲霜灵的能力明显强于敏感和低抗菌株,这种适应能力随着甲霜灵浓度的增加而减弱。这与夏晓明等^[5]的研究结果(180 min)一致。

甲霜灵的抑菌机制为特异性地抑制 RNA 聚合酶(主要负责 rRNA 合成)或(主要负责 mRNA 合成)的活性^[8],即抑制可能与抗性有关的特异蛋白质的合成。本研究结果表明,烟草黑胫病菌高抗甲霜灵菌株体内不存在像石志琦等^[2]、张永杰等^[4]和夏晓明等^[5]研究中认为的可能存在高速排泄抗性机制,但高抗菌株能抵抗甲霜灵对其细胞膜造成伤害,表现为菌落生长抑制率的下降。据此,作者推测上述与抗性有关的特异蛋白质可能参与了细胞膜透性的调控,该结论尚需进一步研究证实。

参考文献:

- [1] YANG Qian(杨谦). Molecular Biology on Resistance of Plant Pathogen(植物病原菌抗药性分子生物学)[M]. Beijing(北京): China Science Press(科学出版社), 2003: 64-66.

- [2] SHI Zhi-qi(石志琦), ZHOU Ming-guo(周明国), YE Zhong-yin(叶钟音). 核盘菌对菌核净的抗性机制初探[J]. Chin J Pestic Sci(农药学学报), 2000, 2(2): 47-51.
- [3] DING Zhong(丁中), LU Feng(刘峰), MU Li-ying(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.
- [4] ZHANG Yong-jie(张永杰), GAO Jun-ming(高俊明), HAN Ju-cai(韩巨才), et al. 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]. J Shanxi Agric Univ, Nat Sci Ed(山西农业大学学报·自然科学版), 2004, 24(1): 34-36.
- [5] XIA Xiao-ming(夏晓明), WANG Kai-yun(王开运), FAN Kun(范昆), et al. 抗戊唑醇禾谷丝核菌的渗透压敏感性及相关渗率变化研究[J]. Chin J Pestic Sci(农药学学报), 2005, 7(2): 126-130.
- [6] ZHENG Xiao-bo(郑小波). Phytophthora and Research Techniques of Phytophthora(疫霉菌及其研究技术)[M]. Beijing(北京): China Agriculture Press(中国农业出版社), 1997: 10-21.
- [7] LU Hong-bin(刘洪斌), GU Bao-gen(顾宝根), LIU Xi-li(刘西莉), et al. 马铃薯晚疫病菌对甲霜灵抗性机制的初步研究[J]. Acta Phytopathologica Sinica(植物病理学报), 2003, 33(2): 178-182.
- [8] DAV DSEL C, HORMAN A E, VOLCHUIS G C M. Specific Interference of Metaxyl with Endogenous RNA Polymerase Activity in Isolated Nuclei from Phytophthora megasperma f. sp. medicaginis[J]. Exp Mycol, 1983, 7: 344-361.

(Ed. JIN S H)

· 会 讯 ·

联合国粮农组织 (FAO) 专家组关于农药管理问题的第三次会议和 FAO /WHO (世界卫生组织) 关于该问题的第一次联合会议将于 2007 年 10 月 22 日至 26 日在罗马召开。这将是 FAO 和 WHO 关于农药管理问题的第一次联合会议。根据双方在 2007 年 3 月签订的协议, 双方拟开展有关农药的有效管理的合作计划。本次会议是该合作计划的一部分。本次联合会议将进一步完善有关指南和管理机制, 以保证国际农药法规在农药贸易和使用方面的措施可以有效实施。会议还包括对现有技术和其他方面指导方针的更新和修正, 以及农药的合理使用。会议还将对“高毒农药”、“特定的监管”以及“国际化学药品管理策略”等进行讨论。

FAO 的食品和环境中药残留专家组和 WHO 评估组即农药残留联席专家委员会 (JM PR) 联合会议于 2007 年 9 月 18 日至 27 日在瑞士的日内瓦召开。会议对大约 30 种农药进行了评估, 还就“可替代 GAPs”、“农药生产厂家不再支持登记农药的 MRL”等做了讨论。

(王静、潘灿平提供)