

· 专论与综述 ·

杀菌剂抗性分子检测技术的研究进展

李红霞, 王建新, 周明国*

(南京农业大学 植物保护学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 靶标病菌基因突变是许多内吸性杀菌剂出现抗性的根本原因, 检测与抗性相关的靶标病菌基因突变对阐明抗药性发生的分子生物学机制及进行早期诊断具有重要意义。目前已成功用于检测靶标病菌抗药性菌株的分子检测技术有6种: 等位基因特异性扩增、限制性片段长度多态性、等位基因特异性寡核苷酸杂交、单链构象多态性、实时定量PCR、变性高效液相色谱分析。这些技术能够快速、灵敏地检测田间早期出现的抗药性或抗药性种群的发展动态, 在病害的可持续管理系统中科学使用杀菌剂方面发挥着重要作用。

关键词: 靶标病菌; 基因突变; 杀菌剂抗性; 分子检测

中图分类号: S481.4 文献标识码: A 文章编号: 1008-7303(2004)04-0001-06

The Progress of DNA-based Approaches for Detection of Fungicide Resistance

L I Hong-xia, WANG Jian-xin, ZHOU Ming-guo*

(College of Plant Protection, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Gene mutation is the fundamental reason why many plant phytopathogenic fungi show the resistance to lots of systemic fungicides. It is important to detect relative gene mutation to reveal molecular mechanism of fungicide resistance and earlier diagnosis. Six molecular techniques have been successfully employed to detect resistant isolates of target fungus, such as Allele-Specific Amplification (ASA), Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP), Allele-Specific Oligonucleotide Hybridization (ASOH), Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP), Quantitative Real-time PCR, Denaturing High-Performance Liquid Chromatography (DHPLC). These modern techniques can detect earlier fungicide resistance or development of resistant sub-population in field timely, quickly and accurately. The increasing use of diagnostic tools to detect fungicide resistance plays an important part in improving the rational use of fungicides for sustainable disease management systems.

Key words: target fungus; gene mutation; fungicide resistance; molecular detection

植物病原物抗药性是指本来对农药敏感的野生病原物, 由于遗传变异而对药剂出现敏感性下降的现象。群体中抗药性菌株的频率和抗药性程度达到某一水平导致药剂常规使用剂量下的防治效果下

收稿日期: 2004-05-08; 修回日期: 2004-08-01

作者简介: 李红霞(1975-), 女, 新疆阿勒泰人, 博士, 讲师, 从事植物病原物抗药性分子生物学研究; 周明国(1954-), 男, 江苏南通人, 教授, 博士生导师, 主要从事植物病害化学防治研究

* 通讯作者; 联系电话: 025-84395641; E-mail: mgzhou@njau.edu.cn

基金项目: 国家高技术发展研究计划(863计划)(2002AA244041; 2004AA249040); 国家自然科学基金(30200181); 南京农业大学青年科技创新基金(KJ04004)。

降或失败,说明此时田间病原菌可能已出现抗性^[1]。在病原群体中不敏感的抗性菌株比例很低时,药剂一般不表现效果下降。由于传统的抗性检测技术(如菌丝生长法、孢子萌发法等)耗费时间和人力,尤其对难培养的病原菌和活体寄生菌的检测过程很难把握,因此在抗性个体频率低于1%以下时,难以用传统的方法检测到抗性菌株的存在^[2]。但是由于病原物的繁殖、传播速度一般都很快,在自然界存在的数量又很大,因此再经过几次药剂选择后,抗性病原亚群体(sub-population)可能会成为致病病原群体中的主体,造成突发性的抗性病害流行。

为了尽早检测出田间是否已出现了抗性和了解抗性的发展动态,有必要针对抗性机制建立相应的特异和灵敏的检测方法;而一种新产品的开发也必须评价其作用机理及抗性的产生机制^[3]。核酸水平的分子诊断技术^[4]能够快速、准确、灵敏地检测出田间早期出现的抗性菌株和监测抗性群体的发展动态,及时指导农民和农药企业调整防治策略,既可确保药剂的防治效果,又能延长杀菌剂的使用寿命。

目前直接检测基因突变的方法有:单链构象多态性(Single-Strand Conformation Polymorphism, SSCP),异源杂合双链技术(Heteroduplex Technology, HTX),变性梯度凝胶电泳(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE),化学裂解法(Chemical Cleavage of Mismatch, CCM),变性高效液相色谱分析(Denaturing High-Performance Liquid Chromatography, DHPLC),毛细管电泳(Capillary Electrophoresis, CE),碱基切割序列扫描(Base Excision Sequence Scanning, BESS),等位基因特异性寡核苷酸杂交(A l l e l e - S p e c i f i c O l i g o n u c l e o t i d e H y b r i d i z a t i o n, A S O H),直接测序法(Direct Sequencing, DS),等位基因特异性扩增(A l l e l e - S p e c i f i c A m p l i f i c a t i o n, A S A),限制性片段长度多态性(Restriction Fragment Length Polymorphism, PCR-RFLP),实时定量 PCR(Quantitative Real-time PCR),单核苷酸引物延伸(Single-Nucleotide Primer Extension, S N u P E X)。现将其中可用于快速检测杀菌剂抗性相关基因突变的方法列举如下。

1 等位基因特异性扩增(A l l e l e - S p e c i f i c A m p l i f i c a t i o n, A S A)

该方法的原理是:由于PCR(Polymerase Chain Reaction)过程中引物延伸是3端开始的,所以3末端的碱基对引物的延伸至关重要。因此在引物设计中,根据已知突变位点在引物3端或中间设计一个错配碱基,使之仅能与敏感型或抗性型互补而只扩增相应的敏感或抗性基因。也可以将多个引物在一个反应体系中进行(多重ASA),其产物通过毛细管电泳完成多个点突变的检测。

作者根据油菜菌核病菌*Sclerotinia sclerotiorum*对多菌灵(carbendazim, MBC)产生抗性是由于 β -微管蛋白基因198位Glu(GAG)点突变为Ala(GCG)所致^[5],设计了以下的特异性引物^[6]:

S-TR (5 TCGA GAACTCTGACGC 3)

S-TS (5 TCGA GAACTCTGACGA 3)

右翼引物SS-1(5 AA GA TA GCA GA GCA GGT 3)

以油菜菌核病菌基因组DNA为模板,当用S-TR/SS-1引物时,能够扩增出一条373 bp片段核酸的菌株即为MBC^{HR}(EC₅₀> 100 μ g/mL),无扩增条带的菌株为MBC^S(EC₅₀< 1 μ g/mL);当用S-TS/SS-1引物时,扩增出373 bp片段核酸的是MBC^S,无扩增条带的为MBC^{HR}菌株。因此通过ASA方法能直接鉴别MBC^{HR}和MBC^S菌株。

Luck等^[7]根据灰霉病菌*Botrytis cinerea*抗性菌株是由于 β -微管蛋白基因198位GAG点突变为GCG引起的,设计了3个引物BCM、BCR和BCF。当引物对BCM与BCR一起扩增时,BCM与敏感菌株的3端A产生错配,故不能扩增出敏感菌株的 β -微管蛋白基因,只能扩增出抗性菌株的基因片段(281 bp)。当用引物BCM、BCR和BCF一起扩增时,抗性菌株可产生381 bp和281 bp两条带,而敏感菌株只产生一条381 bp的条带。

等位基因特异性扩增方法已成功用于检测大麦云纹斑病菌*Rhynchosporium secalis*^[8]、马铃薯块茎斑点病菌*Helminthosporium solani*^[9]、苹果黑星病菌*Venturia inaequalis*、日本梨黑星病菌*V. nashicola*^[4]、苹果褐腐病菌*Monilinia fructicola*^[10]对苯并咪唑类杀菌剂的抗性;小麦白粉病菌*Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*^[11]、香蕉黑斑病菌*Mycosphaerella fijiensis*^[12]、黄瓜霜霉病菌*Pseudoperonospora cubensis*^[13]、黄瓜白粉病菌

Podospaera fusca^[13]、链格孢属 *A lternaria* spp.^[14] 等对甲氧丙烯酸酯类杀菌剂的抗药性; 及 *E. gram inis f. sp. hordei*^[15]、意大利青霉 *Penicillium italicum* 和葡萄白粉病菌 *Uncinula necator*^[16] 对 DM Is 类杀菌剂的高水平抗药性菌株。

2 限制性片段长度多态性 (Restriction Fragment Length Polymorphism, PCR-RFLP)

该方法根据单碱基突变会导致抗药性菌株获得或丧失某些限制性酶切位点, 进行定性检测。如 *S. sclerotiorum* 的 MBC^{HR} 菌株 β -微管蛋白基因第 197 位密码子 GAC 与 198 位密码子 GCG 形成一个 *Tha*I 限制性酶切位点 (CGCG)^[6], 因此只有 MBC^{HR} 菌株才能被 *Tha*I 酶切, MBC^S 菌株则不被酶切。用引物 B1/B3 扩增出一段 874 bp 的片段, 用 *Tha*I 酶切后, MBC^{HR} 菌株的核酸可产生 193 bp 和 681 bp 两个片段, 而 MBC^S 菌株只有一条 874 bp 片段。

M cKay 等^[9]根据 *H. solani* 对苯菌灵 (benomyl, 简称为 ben) 的抗药性是由于 β -微管蛋白基因 198 位 GA G (Glu) 点突变为 GCG (Ala) 或 CA G (Gln), ben^S 菌株 198/199 位形成 *B sa*I 酶切位点 (3 CCA GA G 5)。对于引物 SS-for 和 SS-rev 的 PCR 产物, ben^S 菌株用 *B sa*I 酶切后有 420 bp、390 bp 和 62 bp 三个片段, 而 ben^R 菌株只有 482 bp 和 390 bp 两个片段。Luck 和 Ishii 等也采用内切酶 *Tha*I 检测了 *B.*

cinerea^[7] 和 *V. nashicola*^[4] 对苯菌灵的抗药性菌株。

目前已明确甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂田间抗性的产生多数是由于靶标病菌的细胞色素 b 基因 (Cyt b) 第 143 位的氨基酸由谷氨酸突变为丙氨酸 (G143A) 或第 129 位氨基酸由苯丙氨酸突变为亮氨酸 (F129L) 所致, G143A 和 F129L 的突变位点又分别形成了等位基因特异性内切酶 *I ta*1 (*Fnu*H4, GCN * GC) 和 *S ty*1 (C * CNN GG) 的酶切位点。目前已用 *I ta*1 和 *S ty*1 成功检测出 *E. gram inis f. sp. tritici*^[12]、*P. fusca*、*P. cubensis*^[13]、*M. fijiensis*^[12]、*A lternaria* spp.^[17]、*V. inaequalis*^[18] 和灰梨孢 *Pyricularia oryzae*、*P. viticola*^[19,20] 对甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂的抗药性菌株。

3 等位基因特异性寡核苷酸杂交 (Allele-Specific Oligonucleotide Hybridization, ASOH)

该方法的原理是利用人工合成的寡核苷酸片段 (一般为 19 个碱基) 作为探针与经 PCR 扩增获得的靶 DNA 进行杂交, 在严格控制杂交条件的前提下, 通过斑点杂交检测, 探针与靶 DNA 片段之间只要有一个碱基不相互配对或错配, 就能快速检出。Koenraad 等^[21]根据 *V. inaequalis* 对苯菌灵的不同抗药性表现型在 β -微管蛋白基因第 198 和 200 位氨基酸不同的点突变情况, 设计了 4 个 ASO 探针, 末端用 γ -³²PATP 标记, 探针如下:

	198	200
A SO ^{S+R}	5 C TCT GAC GAG ACA TTC TG 3	
A SO ^{MR}	5	C GAG ACA TAC TGC TGG ATTGA 3
A SO ^{HR}	5 C TCT GAC AAG ACA TTC TG 3	
A SO ^{VHR}	5 C TCT GAC GCG ACA TTC TG 3	

将包含编码 198 至 200 位氨基酸密码子的 PCR 产物用碱性溶液变性, 将其斑点印迹结合在尼龙膜上, 再用以上 4 个 ASO 探针与尼龙膜上的斑点进行杂交, 根据杂交印迹, 可鉴别相应的抗药性表型。最佳的杂交和洗膜温度条件分别为 64、61、61 和 63。

W heeler 等根据 *R. secalis* 对苯菌灵的抗药性是由于 β -微管蛋白基因 198 位点突变使得 Glu 被 Gly 或 Lys 替代引起的, 设计了 3 个包含 15 个碱基的 ASO 探针, 探针末端用 γ -³²PATP 或生物素标记, ASO 探针如下:

	198
A SO ^S	5 TCT GAT GAG ACC TTC 3
A SO ^{R1}	5 TCT GAT GGG ACC TTC 3
A SO ^{R2}	5 TCT GAT AAG ACC TTC 3

将 PCR 扩增所得的 DNA 碱变性后, 斑点印迹结合在尼龙膜上, 再用 ASO 探针杂交, 此后通过严格的洗膜温度 (40、48、50), 除去有碱基错配的探针。根据各个菌株的 PCR 产物所结合的 ASO 探针类型, 以检测抗性 (R1 和 R2)、敏感 (S) 菌株。

4 单链构象多态性 (Single-Strand Conformation Polymorphism, SSCP)

1989年Orita^[22]等提出的单链构象多态性(SSCP)作为一种检测基因突变的方法,经不断改进和完善,更为简便、快速、灵敏,可用于检测基因点突变及短序列的缺失和插入,是目前最常用的检测未知点突变的方法。其原理是:在不含变性剂的中性聚丙烯酰胺凝胶中,单链DNA的迁移率除与DNA长度有关外,更主要决定于DNA单链所形成的空间构象,相同长度的单链DNA因其顺序不同或单个碱基差异,所形成的构象就会不同。PCR产物经变性后进行DNA凝胶电泳时,每条单链处于一定的位置,靶DNA中若发生碱基缺失、插入或置换时,就会出现泳动变位,从而提示该片段基因变异的存在。

PCR-SSCP技术的优点有:操作简单,不需要特殊仪器,技术容易掌握;实验步骤少,周期短;费用低,所用试剂均价格低廉;可用非同位素法检测;适用于大样品筛选。如能采用本法筛选出所需测序的样品,可大大避免盲目测序带来的人力、物力和时间上的浪费,加快测序工作的进度。

PCR-SSCP技术的缺点是不能确定变异的位置,检测时可能出现假阳性。其中单链DNA片段越小,检测的灵敏度越高。Orita认为SSCP能检出250~300 bp DNA片段中一个碱基的变异, Hayashi认为SSCP分析对于小于400 bp的PCR产物最有效。

Ishii等^[4]第一次将SSCP用于检测日本梨黑星病菌对苯并咪唑类杀菌剂的抗药性,并采用毛细管电泳和荧光检测系统分离PCR产物。

5 实时定量PCR (Quantitative Real-time PCR)

严格意义的实时定量PCR技术是指用SYBR Green I荧光染料和荧光探针(如TaqMan探针、分子信标)通过监测PCR过程(扩增效率)达到精确定量起始模板数的目的,同时以内参对照有效排除假阴性结果。由于荧光标记物与扩增产物结合后,被激发的荧光强度和扩增产物成正比,在反应体系和反应条件完全相同时,样本含量应与扩增产物的对数成正比,故在一定条件下荧光强度和样本含量成正比。根据PCR扩增呈指数增长的原理,实时定量PCR就是在指数增长期根据荧光信号的变化实现对原始模板的准确定量。

SYBR Green I是一种只与DNA双链结合的荧光染料,当它与DNA双链结合时,发出荧光,从DNA双链上释放出来时,荧光信号急剧减弱。因此,在一个体系内,其信号强度代表了双链DNA分子的数量。SYBR Green I荧光染料能与所有的DNA双链结合,对DNA模板没有选择性,所以特异性不如TaqMan探针,但成本低廉。Fraaije等^[23]用Sybr green I荧光染料的定量PCR诊断*E. graminis* sp. *tritici*和*Septoria tritici*对甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂的抗药性,同时建立了基于定量PCR和TaqMan荧光染色探针微孔平板包埋技术的抗药性相关基因点突变检测技术。Sirven等^[24]用Sybr green I(Roche)荧光染料结合定量PCR检测了*Plasmopara viticola*对咪唑菌酮(fenamidone)的抗药性。

PCR扩增时在加入一对引物的同时加入一个特异性的荧光探针(如TaqMan探针),该探针为寡核苷酸,两端分别标记一个报告荧光基团(Reporter)和一个淬灭荧光基团(Quencher)。探针完整时,报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收,仪器检测不到信号;PCR扩增时,Taq酶在链延伸过程中遇到与模板结合的探针,其5'→3'外切酶活性将探针酶切降解,使报告荧光基团和淬灭基团分离,能量不能被吸收,即产生荧光信号。所以每经过一个PCR循环,荧光信号和目标片段一样,有一个同步指数增长的过程。

定量PCR由于具有快速、灵敏、可靠和高通量检测的优点,已被越来越多地用于检测田间抗药性群体的发展动态。本实验室已开始使用TaqMan探针标记的定量PCR方法监测田间*S. sclerotiorum*抗多菌灵的群体发展态势。

6 变性高效液相色谱分析 (Denaturing High-Performance Liquid Chromatography, DHPLC)

代表突变检测手段新进展的DHPLC技术,包括突变位点的特异性扩增片段和用高压液体层析法(HPLC)将异质性双链分开、半定量检测,适合于高通量检测不同基因的多重作用。样本在变性条件下,泳动于55℃的吸收剂中,依靠双链碱基组成的构象差异,只需泳动5 min,即可根据洗脱峰型的差异判断目标基因有无发生突变。DHPLC通过自动化程序式操作即可完成对外显子大小片段的全部检测,

该技术的最大优点是高效、简便、省时、无放射性污染,可提高检测的灵敏度。DHFLP已用于检测 *B. graminis* f. sp. *tritici*^[25]、*V. inaequalis* 和 *P. viticola*^[18]对甲氧丙烯酸酯类杀菌剂的抗药性。由于这种方法需要专门的仪器,目前在国内还未用于检测田间病原菌的抗药性。

综上所述,使用分子方法检测杀菌剂的抗药性适用于: 1) 已知与抗药性相关的基因及其突变位点和突变类型。2) 抗药性菌株来自田间而非室内突变体,具有稳定的生物学特性,最好是单孢分离的菌株,能够代表田间抗性群体。3) 基因组上的碱基突变与表现型之间关系明显。

最常用的分子检测方法是用限制性内切酶的PCR-RFLP,因为酶切过程和电泳检测是定性的,能直接检测出是否存在突变的等位基因。普通ASO-PCR法是半定量的,但是通过定量PCR仪用SybrGreen荧光染料或特异性探针TaqMan能检测出田间出现极低的抗性频率(10^{-4} ~ 10^{-5})。SSCP和DHPLC方法在不知道该片段的准确序列时,也能检测出1个或几个不同等位基因的差异。

但是,如果在病原菌群体中存在已知抗药性基因以外的抗药性机制时,采用分子检测的方法会过低估计或评价抗药性病原群体的发展态势。

参考文献:

- [1] ZHOU Ming-guo(周明国). Fungicide resistance of plant pathogens(植物病原物抗药性)[A]. Zhou Ming-guo(周明国). Chemical Control of Plant Disease in China(中国植物病害化学防治研究)[C]. Beijing(北京): Chinese Agricultural Science and Technology Press(中国农业科技出版社), 1998: 50-61.
- [2] Ishii H. Monitoring of fungicide resistance in fungi: biological to biotechnological approaches [A]. CRC Hand Book of Pest Management in Agriculture [M]. Boca Raton: CRC Press, 1995: 679-684.
- [3] Gullino M L, Leroux P, Smith C M. Uses and challenges of novel compounds for plant disease control [J]. *Crop Protection*, 2000, 19: 1-11.
- [4] Ishii H. DNA-based approaches for diagnosis of fungicide resistance [A]. Clark J M, Yamaguchi I. Agrochemical Resistance: Extent, Mechanism and Detection [C]. Washington DC: American Chemical Society, 2002: 242-259.
- [5] LI Hong-xia(李红霞), ZHOU Ming-guo(周明国), LU Yue-jian(陆悦健). 四种不同植物病原真菌与多菌灵抗药性相关基因突变的比较研究 [J]. *J Nanjing Agric Univ* (南京农业大学学报), 2002, 25(3): 41-44.
- [6] LI Hong-xia(李红霞), LU Yue-jian(陆悦健), ZHOU

Ming-guo(周明国). 应用PCR方法检测油菜菌核病菌对多菌灵的抗药性[J]. *Mycosystema* (菌物系统), 2002, 21(3): 370-374.

- [7] Luck J E, Gillings M R. Rapid identification of benomyl resistant strains of *Botrytis cinerea* using the polymerase chain reaction [J]. *Mycological Research*, 1995, 99(12): 1483-1488.
- [8] Wheeler I E, Kendall S I, Butters J, et al. Using allele-specific digonucleotide probes to characterize benzimidazole resistance in *Rhynchosporium secalis* [J]. *Pestic Sci*, 1995, 43: 201-209.
- [9] McKay G J, Cooke L R. A PCR-based method to characterize and identify benzimidazole resistance in *Helmintosporium solani* [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1997, 152: 371-378.
- [10] Ma Z. Based on point mutations in beta-tubulin gene, allele-specific PCR assays were developed for rapid detection of benzimidazole-resistant isolates of *Monilinia fructicola* from stone fruits [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69: 7145-7152.
- [11] Sierotzki H, Wullschlegel J, Gisi U. Point mutation in cytochrome b gene conferring resistance to strobilurin fungicides in *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* field isolates [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2000, 68: 107-112.
- [12] Sierotzki H, Parisi S, Steinfeld U, et al. Mode of resistance to respiration inhibitors at the cytochrome bcl enzyme complex of *Mycosphaerella fijiensis* field isolates [J]. *Pest Management Science*, 2000, 56: 833-841.
- [13] Ishii H, Fraaije B A, Sugiyama T, et al. Occurrence and molecular characterization of strobilurin resistance in cucumber powdery mildew and downy mildew [J]. *Phytopathology*, 2001, 91: 1166-1171.
- [14] Ma Z, Michailides T J. An allele-specific PCR assay for detecting azoxystrobin-resistant *A. lternaria* isolates from *Pistachio* in California [J]. *Journal of Phytopathology*, 2004, 152(2): 118-121.
- [15] D'êye C, Bousset L, Corio-Costet M F. PCR cloning and detection of point mutations in the eburicol 14 α -demethylase (CYP51) gene from *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*, a "recalcitrant" fungus [J]. *Curr Genet*, 1998, 34: 399-403.
- [16] D'êye C, Laigret F, Corio-Costet M F. A mutation in the 14 α -demethylase gene of *Uncinula necator* that correlates with resistance to a sterol biosynthesis inhibitor [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63: 2966-2970.
- [17] Ma Z, Felts D, Michailides T J. Resistance to

- azoxystrobin in *A lternaria* isolates from pistachio in California [J]. *Pesticide Biochemistry & Physiology*, 2003, 77: 66-74
- [18] Sierotzki H, Gisi U. Molecular diagnostics for fungicide resistance in plant pathogens [A]. Voss G, Ramos G. Chemistry of Crop Protection [C]. Germany, 2003 71-88
- [19] Avila-A dame C, Koller W. Impact of alternative respiration and target-site mutations on responses of germinating conidia of *M agnaporthe grisea* to Qo-inhibiting fungicides [J]. *Pest Manag Sci*, 2003, 59: 303-309
- [20] Kim Y S, Dixon E W, Vincelli P, et al. Field resistance to strobilurin (Qo D) fungicides in *Pyricularia grisea* caused by mutations in the mitochondrial cytochrome b gene [J]. *Phytopathology*, 2003, 93: 891-900
- [21] Koenraadt H, Jones A L. The use of allele-specific oligonucleotide probes to characterize resistance to benomyl in field strains of *V enturia inaequalis* [J]. *Phytopathology*, 1992, 82: 1354-1359
- [22] Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, et al. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using polymerase chain reaction [J]. *Genomics*, 1989, 8(5): 874-879
- [23] Fraajie B A, Butters J A, Coelho J M, et al. Following the dynamics of strobilurin resistance in *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* using quantitative allele-specific real-time PCR measurements with fluorescent dye SYBR Green 1 [J]. *Plant Pathology*, 2002, 51(1): 45-54
- [24] Sirven C, Beffa R. Resistance to fenamidone: monitoring by real-time quantitative PCR on *Plasmopara viticola* [J]. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 2003, 56(3): 523-532
- [25] Baumler S, Sierotzki H, Gisi U, et al. Evaluation of *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* field isolates for resistance to strobilurin fungicides with different SNP detection systems [J]. *Pest Management Science*, 2003, 59(3): 310-314

(责任编辑: 唐 静)

欢迎订阅《农药学学报》第7卷(2005年)

邮发代号 2-949 A4开本 96页 彩色四封

《农药学学报》是由中国农业大学主办、国内外公开发行的农药学综合性学术期刊, 主要面向农药研究工作者、植保工作者及大专院校师生。旨在及时、全面报道农药学各分支学科有创造性的最新研究成果与综合评述, 是了解我国农药研究动态的理想园地。

本刊现设三个栏目: 专论与综述、研究论文及研究简报。所发表的论文涵盖了农药学所有分支领域, 主要包括合成与构效关系、分析与残留、环境与毒理、作用机制研究、制剂加工及应用等。

本刊现已被美国《化学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、英国《动物学记录》等8家国外重要检索机构收录; 同时是“中国科技核心期刊”、《中国科学引文数据库扩展库》来源期刊、《中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)》统计源期刊以及《中国核心期刊(遴选)数据库》收录期刊。

《农药学学报》现为A4开本, 邮政发行(邮发代号2-949), 国内定价15元, 全年4期共60元。订户可通过当地邮局订阅, 也可直接向本刊编辑部索取订单或直接从邮局汇款购买。(1999~2004年已出版期刊, 本编辑部还有少量库存, 欢迎订阅, 价格优惠20%)。

汇款请寄: 北京海淀区圆明园西路2号中国农业大学理学院《农药学学报》编辑部

邮 编: 100094 联系人: 唐 静 电 话: 010-62733003 E-mail: nyxuebao@263.net
银行汇款

开户行: 海淀联社营业部东北旺农信社农大分社

户 名: 农药学学报编辑部 帐 号: 0407030103000000706

欢迎投稿 欢迎订阅 欢迎发布广告