

• 专论与综述 •

病原菌对 Strobilurin 类杀菌剂 抗药性机理的研究进展

贾俊超, 马琳, 范志金*, 夏倩, 刘秀峰

(南开大学 元素有机化学国家重点实验室, 天津 300071)

摘要: 结合 strobilurin 类杀菌剂作用机制的特点, 通过室内和田间研究的结果总结了病原菌对该类杀菌剂产生抗药性的主导机制。Strobilurin 类杀菌剂主要结合于病原菌细胞色素 bc_1 复合物中细胞色素 b 部分的 Q_o 位点, 而细胞色素 b 由突变率很高的线粒体基因组编码, 所以病原菌很容易因该基因的突变而导致抗药性发生。至今已至少有 14 种寄主植物上的 25 种病原菌在田间表现出了对 strobilurin 类杀菌剂的抗药性。抗药性产生的主要机理是病原菌细胞色素 b 的氨基酸残基发生了单点取代。田间抗性菌株的主要取代位点是 G143A、F129L 和 G143R。一些非靶标生物细胞色素 b 的 143 位为丙氨酸, 这可能是 strobilurin 类杀菌剂对其表现安全性的原因之一。由于锈病菌 *Puccinia* spp 中内含子剪切位点恰好出现在编码 G143 的 GGT 之后, G143A 的突变会导致突变菌株的死亡, 因而它们在田间不会表现出抗药性。此外, Q_o 抑制剂阻断电子传递后会导致胞内活性氧 (ROS) 的增加, 而 ROS 可以诱导细胞交替氧化酶 (AOX) 的表达, 进而启动线粒体的旁路氧化途径, 使病原菌表现出抗药性。因此, 病原菌氨基酸残基的单点取代和交替氧化途径是导致病原菌对 strobilurin 杀菌剂产生抗药性的主导机制。

关键词: strobilurin 类杀菌剂; 抗药性机理; 田间抗药性; 交替氧化酶

中图分类号: S481.1

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2008)01-0001-09

Progress on Study of Resistance Mechanism of Strobilurin Fungicides

JIA Jun-chao, MA Lin, FAN Zhì-jīn*, XIA Qian, LIU Xi-feng

(State Key Laboratory of Elemento-organic Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract The main resistance mechanism of strobilurin fungicides was reviewed according to the documents of laboratory studies and field experiments and their characteristics of mode of action. Strobilurin fungicides mainly bind to Q_o site of cytochrome b of the cytochrome bc_1 complex in fungi. Since cytochrome b is coded by mitochondrial DNA with high mutant frequency, fungi are easily to express resistance to Q_o inhibitors as a result of the DNA mutation. After 10 years of field application, at least 25 pathogens on 14 hosts have already developed resistance to strobilurin fungicides. The resistance mechanism of strobilurin fungicides is mainly amino acid residue single point substitution of the cytochrome b in fungi and the substitution in the field resistance was G143A, F129L or G137R, respectively. However, in some non-target organism the amino acid residue 143 of the cytochrome b is

收稿日期: 2007-06-18 修回日期: 2007-11-01

作者简介: 贾俊超 (1983-), 男, 山东费县人, 硕士研究生; * 通讯作者 (Author for correspondence): 范志金 (1968-), 男, 四川乐山人, 副教授, 从事农药化学和农药生物学的研究. 联系电话: 022-23504365; E-mail: fanzj@nankai.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (20672062); 国家重点基础研究发展计划“973”项目 (2003CB114402); 天津市自然科学基金 (批准号: 07JCYBJC01200); 天津市科技支撑计划国际科技合作项目 (07ZCGHHZ01400).

alanine and this is the reason of why they show resistance to strobilurin fungicides in all probability. Since the intron scissor position of rust pathogens (*Puccinia* spp.) tagged behind GGT encoding G 143 in cytochrome b and the substitution of G 143A would cause the death of the pathogen, therefore rust seldom develops resistance to strobilurin fungicides that caused by substitution of G 143A in the field. Furthermore, if Qo inhibitors inhibit the electron transport in mitochondria, the reactive oxygen species (ROS) will burst which will induce cells to express alternative oxidase (AOX) and subsequently startup alternative pathway to cause resistance towards strobilurin fungicides. Therefore, amino acid residue single point substitution and expression of AOX are the main mechanisms of fungi resistance to strobilurins.

Key words strobilurin fungicides; resistance mechanism; field resistance; alternative oxidase

Strobilurin类杀菌剂是在天然活性物质嗜球果伞菌素 A (strobilurin A)、嗜球果伞菌素 B (strobilurin B)、小奥德蘑素 A (oudemansin A) 及粘噻唑 (myxothiazol) 结构和作用机理研究的基础上发现的^[1], 统称为 strobilurins。Strobilurins 的作用靶点是线粒体呼吸链上细胞色素 b₆ 复合物的 Q_o 位点, 属于单一作用位点杀菌剂。Strobilurins 主要结合于病原菌细胞色素 b 部分的 Q_o 位点, 而细胞色素 b 由突变率很高的线粒体基因组编码, 该基因很容易发生突变而引起靶点的氨基酸序列发生改变, 从而导致抗药性的产生^[2-3]。目前该类杀菌剂已成功开发出十多个产品, 分别是啞菌酯 (azoxystrobin) (先正达)、醚菌酯 (kresoxim-methyl) (巴斯夫)、苯氧菌胺 (metominostrobin) (盐野义)、肟菌酯 (trifloxystrobin) (拜耳)、啞氧菌酯 (picoxystrobin) (先正达)、啞菌胺酯 (pyraclostrobin) (巴斯夫)、氟啞菌酯 (fluoxastrobin) (拜耳)、烯肟菌酯 (enestrobin) (沈阳化工研究院)、醚菌胺 (dinoxystrobin) (巴斯夫) 和肟醚菌胺 (orysastrobin) (巴斯夫) 等^[4-7]。有关的研究开发仍在进行, 但是该类杀菌剂在田间极易产生抗药性的特点, 已经极大地限制了它们的应用。杀菌剂抗性行动委员会 (Fungicide Resistance Action Committee, 简称 FRAC) 已将其列为了高抗药性风险类杀菌剂^[8]。此外, 杜邦公司开发的啞啞菌酮 (famoxadone) 和安万特公司 (Aventis, 现已并入拜耳公司) 开发的啞啞菌酮 (fenamidone) 与 strobilurins 结构上并无相似性, 但因其都作用于线粒体呼吸链细胞色素 b₆ 复合物的 Q_o 位点, 具有交互抗性, 所以统称为 Q_o 抑制剂 (Q_o inhibitors, QoIs)^[4-9-12]。有关病原菌对 Q_o 抑制剂产生抗药性的研究已有 20 多年的历史, 但有关抗性机理方面的综述不多^[2-13-15]。已有的综述着重论述病原菌体内发生哪些改变将会导致抗药性的产生, 缺乏对抗药性机理的系统分析。作者通过对 strobilurin 类杀菌剂室内和田间

抗药性的研究进展进行综述, 指出了导致抗药性产生的基因突变、氨基酸残基取代和其他呼吸途径, 并从药剂与靶位点的结合, 以及诱导其他呼吸途径的信号通路等方面对抗性机理进行了阐释, 此外还介绍了抗性位点在不同生物间的差异以及这些差异的生物学意义。

1 室内和田间抗药性

在人工合成的 strobilurin 类杀菌剂开发成功之前, 室内通过天然 strobilurins 与其靶酶结合的研究发现了细胞色素 b 上能引起抗药性的主要区域 (F129-I147, B256-L275) 和主要的抗药性位点, 其中包括后来在田间广泛发现的 G 143A 的取代突变^[16-17]。早期通过对啞菌酯 (ICIA5504) 的抗药性评估发现该药能激活病原菌体内的交替 (旁路) 氧化途径 (alternative oxidative pathway), 从而导致抗药性的发生^[18], 该结论后来在田间得到证实。目前, 通过室内汰选已获得至少 8 种对 strobilurin 类杀菌剂产生抗药性的植物病原菌, 分别是 *Alternaria alternata* (阿月混子疫病菌), *Alternaria arborescens* (阿月混子疫病菌), *Alternaria tenuissima* (阿月混子疫病菌), *Botrytis cinerea* (灰葡萄孢), *Mycovellosiella natrassii* (小麦叶枯病菌, 同 *Septoria tritici*), *Pythium aphanidermatum* (草坪疫病菌), *Ustilago maydis* (玉米黑粉病菌) 和 *Venturia inaequalis* (苹果疮痂病菌)^[19]。自 1998 年在德国田间首次发现小麦白粉病菌 *Erysiphe graminis* DC f. sp. *tritici* Marchal 对啞菌酯、醚菌酯和肟菌酯产生抗性后^[9, 20], 目前已在田间发现 25 种病原菌在 14 种寄主作物上表现出对 strobilurin 类杀菌剂的抗药性 (见表 1)。QoIs 杀菌剂的主要生产商 (先正达、拜耳、杜邦和巴斯夫) 在欧洲、澳大利亚及巴西的田间抗药性监测结果表明: *Blumeria*

表 1 Strobilurin类杀菌剂的田间抗药性^[21]

Table 1 Field resistance of pathogens to strobilurin fungicides^[21]

Pathogen 病原	Common name 通用名	Host 寄主	Geographical distribution 地理分布	Mechanism of resistance 抗药性机理
Alternaria alternata, A. tenuissima, A. arborescens	Alternaria Blight (疫病)	Pistachio (阿月浑子)	USA	G143A
Alternaria mali	Alternaria Blotch(叶疱斑病)	Apple(苹果)	USA	G143A
Alternaria solani	Early Blight(早疫病)	Potato(蕃茄)	USA	F129L
Blumeria graminis f. sp. tritici and hordei (= E. graminis f. sp. tritici and hordei)	Powdery Mildew (白粉病)	Wheat and Barley (小麦和大麦)	EU, New Zealand ^[22]	G143A
Colletotrichum graminicola	Anthraco-se(炭疽病)	Turfgrass(草皮草)	USA	G143A
Corynespora cassicola	Leaf Spot(叶斑病), Target Spot(轮斑病)	Cucumber(黄瓜)	Japan	G143A
Dilella bryoniae	Gummy Stem Blight(蔓枯病)	Cucurbit(葫芦)	USA	G143A
Erysiphe necator	Powdery Mildew (白粉病)	Grapes(葡萄)	USA, EU	G143A
Glomerella cingulata = Colletotrichum gloeosporioides	Anthraco-se(炭疽病)	Strawberries(草莓)	Japan	G143A
Mycosphaerella fijiensis	Black Sigatoka(黑条叶斑病)	Banana(香蕉)	USA, New Zealand ^[22]	G143A
Mycosphaerella graminicola	Septoria leaf spot(叶枯病)	Wheat	EU	G143A, AOX ^[23]
Mycovellosiella natansii	Leaf Mold(叶霉病)	Eggplant(茄子)	Japan	G143A
Pyrenophora tritici-repentis	Tan Spot(黄斑病)	Wheat	EU	G143A, F129L, G137R
Plasmopara viticola	Downy Mildew (霜霉病)	Grape	EU, New Zealand ^[22]	G143A, F129L
Pseudoperonospora cubensis	Downy Mildew	Cucurbits	EU, Asia	G143A
Pyrenophora teres	Net Blotch(网斑病)	Barley	EU	F129L
Pyricularia grisea	Gray Leaf Spot(灰斑病)	Turfgrass	USA	G143A, F129L
Pythium aphanidermatum	Pythium Blight(疫病)	Turfgrass	USA	F129L
Ranularia colly-cygni	Ranulario-se	Barley	EU	G143A
Sphaerotheca fuliginea	Powdery Mildew	Cucurbits	EU, Asia New Zealand ^[22]	G143A
Stemphylium vesicarium	Brown spot(褐斑病)	Asparagus and Pear (石刁柏和梨)	EU	G143A
Venturia inaequalis	Scab(黑星病)	Apple	EU	G143A
Venturia pirina	Scab(疮痂病)	Pears	USA	G143A

graminis f. sp. tritici(小麦白粉病菌), B. graminis f. sp. hordei(大麦白粉病菌), S. tritici(小麦叶枯病菌), Pyrenophora tritici-repentis (小麦黄斑病菌), Plasmopara viticola (葡萄霜霉病), Pyrenophora teres (大麦网斑病菌), V. inaequalis (苹果疮痂病菌)和 Sphaerotheca fuliginea (黄瓜白粉病菌)已经在部分地区表现出对 QoIs中等程度或很高的抗性水平 (resistance level)或抗性频率 (resistance frequency); 但尚未监测到 Puccinia recondite(小麦叶锈病菌), Rhynchosporium secalis (大麦云纹病菌), Uncinula necator(葡萄白粉病菌), Stemphylium vesicarium (梨叶疫病病菌), Phytophthora infestans(蕃茄、马铃薯晚疫病病菌), Alternaria solani(蕃茄、马铃薯早疫病病菌),

Phakopsora pachyrhiza (大豆锈病菌), B. cinerea (草莓灰霉病菌)和 Sclerotinia sclerotiorum (油菜菌核病菌)对 QoIs的抗药性, 或者抗药性水平、抗性频率还比较低^[10].

2 靶标氨基酸残基取代突变位点和产生抗药性的分子机理

2.1 导致抗药性的氨基酸残基取代位点和基因突变

二十多年的室内和田间抗药性研究发现, 对 QoIs产生抗药性的生物主要是其细胞色素 b的 127~ 147位和 256~ 296位氨基酸序列区内的氨基酸残基发生了单点取代突变^[2, 17, 24, 25]。在 127~ 147位区域的取代大多表现出非常高的抗性水平,

如双核小草履虫在 G 143T 和 G 137T 发生取代后, 其抗性倍数 (resistance factors, RF) 均高达 22 000 倍。对 strobilurin 类杀菌剂田间抗性菌株的研究发现, 田间引起抗药性的氨基酸残基取代——G 143A、F 129L 和 G 137R 的取代全部位于上述区域。其中 G 143A 取代的有 20 种, F 129L 取代的有 6 种, G 137R 取代的有 1 种 (见表 1)。由 G 143A 的取代导致的抗药性, 其抗性倍数一般在 100 倍以上; 由 F 129L 和 G 137R 的取代导致的抗性倍数一般在 5~ 15 倍之间, 少数会大于 50 倍^[26]。

病菌细胞色素 b 基因中的单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 是 strobilurin 类杀菌剂产生抗药性的根本原因^[26-27]。G 143A 的取代在分子水平上是由于核苷酸残基密码子 GGT 突变为 GCT 造成的^[28-31]; 而 F 129L 的取代则不但可由核苷酸残基 TTC 突变为 CTC 引起^[28-31], 还可由 TTC 突变为 TTG 或 TTA 造成^[28]。Sierotzki 等的研究表明, 导致 F 129L 取代的 *P. teres* (2004 年分离于欧洲各国) 突变频率为 3.7%, 其中发生 CTC、TTA 和 TTG 突变的频率分别占突变菌的 20%、43% 和 37%^[28]; G 137R 的取代是由核苷酸残基 GGG 突变为 AGG 造成的^[28]。

2.2 靶标位点氨基酸残基被取代引起抗药性的分子基础

导致对 strobilurin 类杀菌剂产生抗药性的直接原因是病原菌细胞色素 b 上的氨基酸残基被取

代, 影响了药剂与靶点的结合。1997 年研究者获得了牛心、小鸡、酵母等生物体的线粒体晶体并成功进行了解析, 揭示了 Q_o 位点的结构和功能^[32-36], 其后通过对 strobilurins 与 bc₁ 复合物共结晶的研究, 为该类药物抗药性相关位点在药剂结合中的作用作了最直接的阐释^[2, 37, 38]。通过对粘噻唑、methoxyacrylate stilbene 嘧菌酯和肟菌酯与牛心和鸡心线粒体 bc₁ 复合物的结合 (见图 1 和图 2) 研究发现, strobilurins 中的甲氧基甲基丙烯酸酯 (methoxyacrylate, 以下简称 MOA) 部分插入到 bc₁ 复合物 C 螺旋的 Phe128 (相当于真菌中 F129) 和 Tyr131 之间, Phe128 处于 MOA 和氧原子的中心部位 (见图 1)。可见, Phe128 可能在与 MOA 类抑制剂的结合中扮演着重要角色。所以在病原真菌中的 F129L 的取代可以表现出很高的抗性水平^[38]。研究还表明, 中心线粒体 bc₁ 复合物的 Gly142 (相当于真菌中的 G 143) 距各 Q_o 抑制剂的距离很近, 仅在 3.5 Å (0.35 nm) 左右^[38], 可以在很大程度上影响各抑制剂与靶点的结合 (如图 2)。为什么没有与 MOA 直接作用的氨基酸残基 (如图 2A 中的 G h272 和 A la126 等) 发生取代导致病原菌抗药性的报道呢? 晶体结构显示, MOA 部分主要是与 Q_o 位点氨基酸残基的主链原子相互作用, 所以, 尽管 MOA 部分为 strobilurin 类杀菌剂的药效基团 (Pharmacophore)^[39], 但直接影响其结合部位的取代可能并不产生抗药性^[38]。

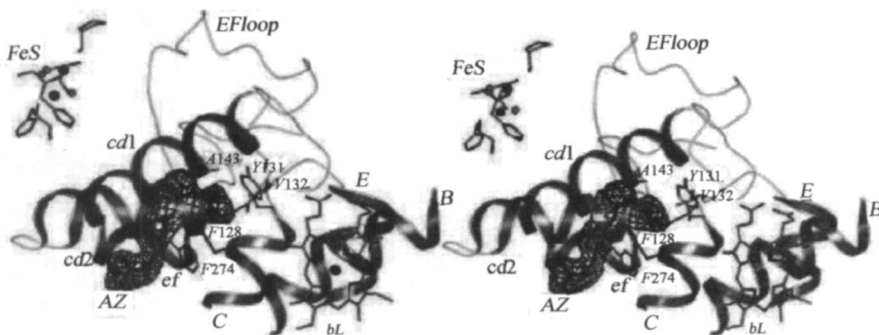


图 1 嘧菌酯 (AZ) 2.2 Å 和 3.2 Å 下晶体结构中的结合环境 (牛心细胞色素 bc₁ 复合物)^[38]

Fig 1 Azoxystrobin (AZ)-binding environment in 2.2 Å and 3.2 Å crystal structure (cytochrome bc₁ complex from bovine heart)^[38]

2.3 不同生物中抗性位点的差异与意义

G 143A 和 F 129L 的取代已在多种田间抗性病菌中被表现, 一般不会影响复合物的功能, 而 G 137R / E / S 取代则会严重影响复合物的酶活性, 从而抑制细胞呼吸作用^[2]。在对一些锈病病菌

Puccinia spp. (包括: 小麦叶锈病菌 *P. recondita* f sp tritici, *P. graminis* f sp tritici, 小麦条锈病菌 *P. striiformis* f sp tritici, 燕麦锈病菌 *P. coronata* f sp avenae, 大麦叶锈病菌 *P. hordei*, *P. recondita* f sp secalis, 玉米锈病菌 *P. sorghi* 和菊花白锈病菌

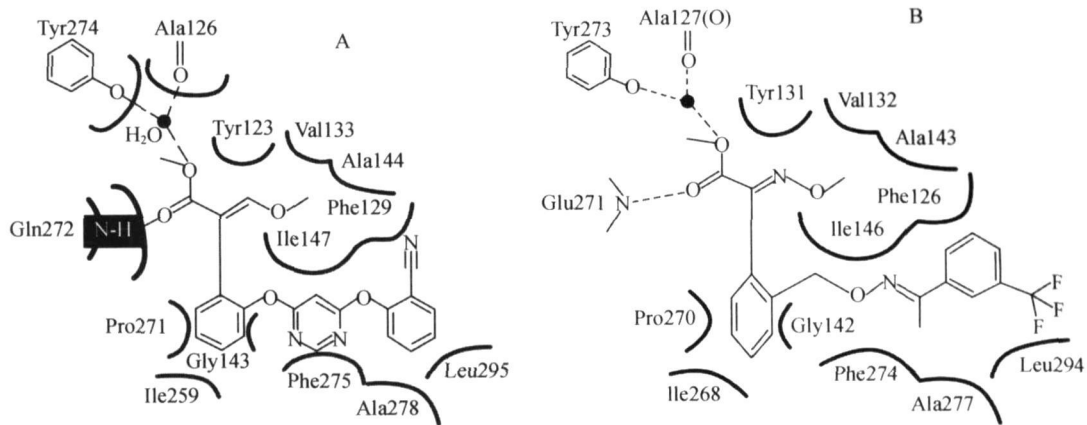


图 2 Strobilurin类杀菌剂与牛心线粒体 bc_1 复合物氨基酸残基的结合模型

Fig 2 Binding pocket of strobilurin fungicides with amino acids residue of bovine mitochondrial cytochrome bc_1 complex

A. 噁菌酯的结合口袋模型 (牛心 bc_1 复合物, 酵母氨基酸残基编号) ^[2]; B. 三氟噁菌酯的结合口袋模型 (牛心 bc_1 复合物, 牛氨基酸残基编号) ^[37].

A. A zoxystrobin binding pocket with amino acids residue (cytochrome bc_1 complex from bovine heart yeast numbering) ^[2];

B. Trifloxystrobin binding pocket with amino acids residue (cytochrome bc_1 complex from bovine heart bovine numbering) ^[37].

P. horiana) 细胞色素 *b* 的基因特点进行研究时发现, 锈病病菌的内含子 (intron) 和外显子 (exon) 都具有很高的同源性, 而且这些内含子恰好出现在田间抗性菌株普遍存在的 G 143 的编码基因 (GGT) 之后^[40], 进一步研究发现, 相同的情况还出现在其他的锈病病菌 *Uromyces appendiculatus* (Pers) Unger, *P. pachyrhizi* Syd & P Syd 和 *Hemileia vastatrix* Berk & Brone, 早疫病病菌 *A. solani* Sorauer^[41] 和网斑病菌 *P. teres* 的细胞色素 *b* 基因组^[28], 而产生抗药性的 *A. alternata*, *B. graminis*, *P. grisea* Sacc, *M. graminicola*, *Mycosphaerella fijiensis*, *V. inaequalis* 和 *P. viticola* 等则在 G 143 的编码基因之后不存在内含子^[41]。因此, G 143 被认为是锈菌、早疫病病菌和网斑病菌 mRNA 前体的剪切识别位点, 如果 GGT 突变为 GCT 将会导致内含子不能被剪切, 从而使细胞色素 *b* 的表达发生错误, 致使突变细胞不能存活。至今很少有锈病病菌对 strobilurin 类杀菌剂产生抗药性的报道 (见表 1), 而早疫病病菌和网斑病菌也仅有因 F129L 发生取代导致抗药性的报道 (见表 1)。最近的研究表明, *P. tritici-repentis* 不仅可以承受 G 143A 取代, 还可以承受 G 137R 的取代 (见表 1)^[28], 具体的机理尚不清楚。

第 143 位氨基酸残基不但在 strobilurin 类杀菌剂与靶点的结合中具有重要作用, 而且还与该类杀菌剂的选择性密切相关。随着对不同生物细胞色

素 *b* 的基因测序的完成和 Qo 抑制剂与细胞色素 bc_1 复合物的共结晶的成功, strobilurin 类杀菌剂具有选择性的分子机理也逐渐明朗起来。为了探究 strobilurins 在靶标菌、分泌天然 strobilurins 的担子菌和非靶标生物之间选择性的分子基础, 对比了靶标菌构巢曲霉 *Aspergillus nidulans* (Eidam) W inter, 酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* Meyer ex Hansen, 裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)、担子菌 *Strobilurus tenacellus* (Per ex Fr) Singer, *Mycena galopoda*, *M. viridimarginata* 和非靶标的苏云金芽胞杆菌 *Bacillus thuringiensis*、小麦 *Triticum aestivum*、紫球海胆 *Strongylocentrotus purpuratus* 等之间细胞色素 *b* 的基因序列, 发现 *M. galopoda*、小麦和紫球海胆的 143 位为丙氨酸 (A), 因而它们对 strobilurins 不敏感^[17, 38, 42], 这也解释了 strobilurin 类杀菌剂对作物和水生生物的安全性。

3 交替氧化途径和生理生化抗性

3.1 交替氧化途径

交替氧化途径最初在植物体内被发现, 简称为交替途径 (alternative pathway, AP), 后来也在真菌和卵菌中被发现, 并成为病原菌对 strobilurin 类杀菌剂产生抗药性的原因之一^[18, 43, 44]。交替氧化酶 (alternative oxidase, AOX) 是该过程的关键酶, 能将 CoQ 传来的电子直接传递给氧生成水, 而不经过复合物 II 和复合物 IV (如图 3)。在病原菌中除 *S. cerevisiae* 和 *S. pombe* 外, AOX 都是由核基因编

码的。交替氧化途径除 AOX 外还有其他的酶,如:膜外的 NADH 脱氢酶 (NDE) 和膜内 NADH 脱氢酶的同工酶 (NDI) (如图 3)^[45], 前者可以直接脱去胞质中 NADH 上的氢, 将电子传递给 CoQ。

AOX 途径释放的电子不与磷酸化偶联, 其前的复合物 I 泵出的质子与 NDE 脱去的质子可以偶联 ATP 的产生, 因此整个交替氧化途径生成 ATP 的效率在 40% 左右^[43~45]。

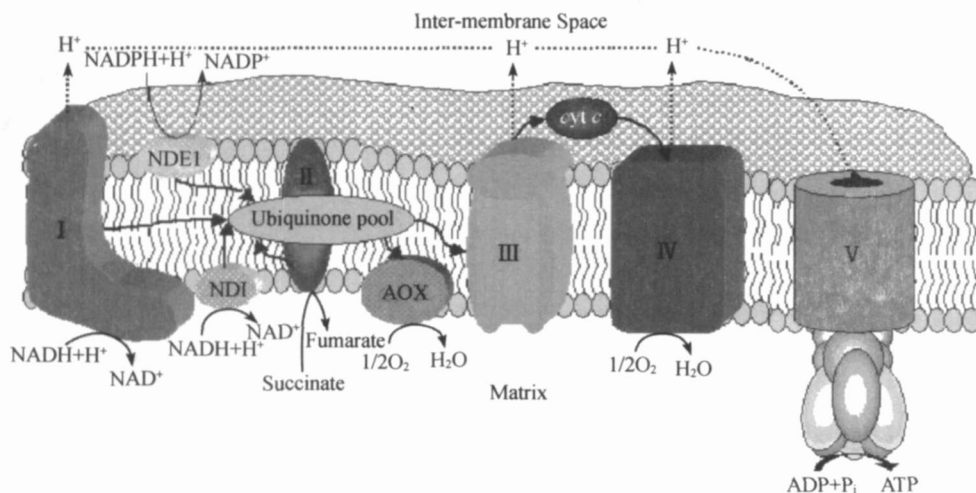


图 3 电子传递呼吸和交替氧化途径 (仿)^[45]

Fig 3 Electron transport respiration and alternative pathway of respiration (imitated)^[45]

由于 AP 中 NADH 传递出的电子只通过复合物 I, 不经过复合物 II 和 IV (如图 3), 因而 AP 可以被鱼藤酮抑制, 而不被抗霉素 A (antimycin A)、strobilurins 和氰化物抑制, 同时 AOX 的活性可以被水杨酸羟肟酸 (salicylhydroxamic acid, SHAM)、烷基五倍子酸 (alkyl gallates) 和 (类) 黄酮类物质抑制, 而 NDE 和 NDI 则缺乏抑制剂^[14]。AOX 在很多真菌如粗糙脉孢霉 *Neurospora crassa*、稻梨孢 *P. grisea* 和小麦叶枯病菌 *S. tritici* 等中为诱导表达型, 即正常条件下其水平很低或检测不到, 但如果以细胞色素为介导的呼吸途径被阻断或线粒体蛋白的合成受到抑制, AOX 则被诱导表达; 而在灰葡萄孢 *B. cinerea* 和小麦全蚀病菌 *Gaeumannomyces graminis var tritici* 中, AOX 则是组成型表达的, 它们对 strobilurin 类杀菌剂的敏感性一般比诱导型的敏感性差^[13 21 44]。

3.2 诱导交替氧化途径导致抗性

因 AOX 被诱导而使病原菌对 strobilurin 类杀菌剂产生抗药性的报道很多, 例如, 早期在室内通过紫外诱变获得的抗啞菌酯的 *S. tritici* 菌株, 其抗性倍数约为 10 倍, 加入 2 mmol/L 的 SHAM 后可使其重新成为敏感菌株, 结果发现该病原菌的 AOX 被诱导表达^[17]。将啞菌酯与 *M. graminicola* 一起培养, 啞菌酯可以抑制 90% 的氧的吸收, 但在

24 h 后氧消耗得以恢复, 此时氧消耗不被抗霉素 A 和氰化物所抑制; 但如果加入 SHAM 则会明显抑制氧消耗, 这也说明病原菌的 AOX 被诱导表达^[23]。对 *V. inaequalis* 施用啞菌酯后, 可导致其分生孢子产生 60 倍的抗药性, 但检测其细胞色素 b 的基因发现其与敏感菌株并无差异, 但加入 SHAM 后发现其对啞菌酯的活性表现出明显的增效作用^[46]。在菌丝液中加入 0.5 mg/mL 的啞菌酯也可引起 AOX mRNA 合成的增加^[47]。可以看出, strobilurin 类杀菌剂能诱导菌株的 AOX 表达, 也是该类杀菌剂易产生抗药性的一个重要原因。

3.3 诱导交替氧化酶表达的信号途径

AOX 如何被诱导表达? 对植物中 AOX 的研究发现, 当泛醌的还原水平低时, 电子几乎全部流经复合物 III; 而当泛醌的还原水平高时, 则驱动电子流向 AOX^[48 49]。氧化损伤和 AOX 表达的关系则更为直接, 抗霉素 A 和苯氧菌胺可分别导致 *Hansenula anomala* 和 *P. grisea* 中过氧根离子的积累, 从而诱导 AP 的启动, 而抑制过氧根产生的黄酮也抑制 AP 的启动^[50~52]。实验还表明, 在 *M. graminicola* 的培养中加入过氧化氢可以诱导 AOX mRNA 的积累^[53]。推测当电子传递链上的复合物 III 或 IV 被抑制时, 会导致氧分子的积累, 并在胞内产生活性氧 (reactive oxygen species ROS) (如

图 4)。这种现象在具氧化还原活性的半泛醌分子积累时更易产生^[54]。Strobilurin类杀菌剂诱导 AOX 表达的机理可能是: 药剂阻断了电子在复合物 II 处的传递, 使病原菌胞内产生 ROS, ROS 造成胞内氧化损伤, 从而诱导 AOX 的表达。泛醌的还原水平、AMP 水平可能是其次级效应。黄酮类物质能通过除去脂质自由基而消除或抑制 ROS, 从而抑制 AOX 的表达 (如图 4)。有关 AP 被激活的信号如何传递? 其间是否也有 cAMP 的参与? 研究表明, 病原菌中 AMP 水平的升高, AOX 的表达水平也相应提高, cAMP 可能是 AMP 传递信号的信使分子^[14]。ROS 的诱导信号也可能是通过丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein

kinase, MAPK) 途径传递的 (如图 4)。动、植物和真菌中的 ROS 在 MAPK 激活中都具有重要作用^[55~57]。研究还表明: ①MAPK 基因缺失的 *S. cerevisiae* 菌株对 strobilurins 更为敏感^[57]; ②能消除真菌体内 ROS 的超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 的表达是通过 MAPK 途径调控的^[58]; ③当精胺 (spermine) 激活烟草体内的 MAPKs 时, AOX 的 mRNA 水平也随之增加^[59]。既然生物可以用 ROS 诱发 MAPK 途径来调控表达 SOD 以减少自身受 ROS 的伤害, 那么也应该可以用 ROS 诱发 MAPK 途径调控表达 AOX 来帮助自身抵消体内 ATP 缺乏的不利影响, 这种推测还需要深入研究才能得以证实。

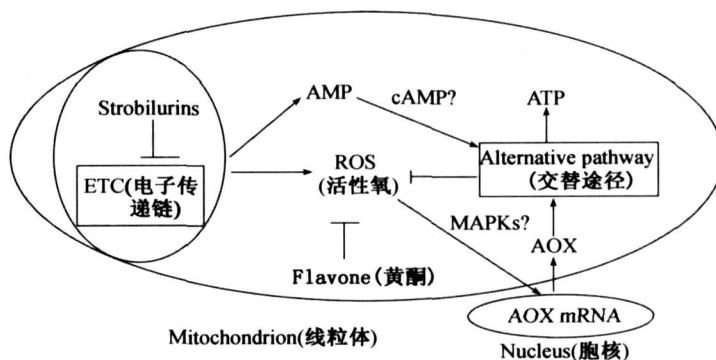


图 4 Strobilurins 诱导交替途径的模式图

Fig. 4 A model for the induction of alternative pathway by strobilurins

注: 箭头直线代表促进或激活; 垂直线代表清除或抑制。

Note: The arrow beeline expressed promotion or activation; the upright beeline expressed scavenging or inhibition.

4 结语

Strobilurin类杀菌剂作用于细胞色素 b 的 Q_o 位点, 而编码细胞色素 b 的线粒体基因的高突变率导致了该类杀菌剂具有很高的抗药性风险, 这已被广泛出现的田间抗药性事例所证实。病原菌基因的自然突变导致其对 strobilurin类杀菌剂产生田间抗药性, 这些突变主要引起细胞色素 b 上 G 143A、F129L 和 G 137R 的氨基酸残基发生单点取代, 其中 G 143 和 F129 的取代在 strobilurin类杀菌剂与 Q_o 位点的结合中扮演了重要角色。Strobilurin类杀菌剂对作物、水生生物和非靶标担子菌具有选择性的分子机理是基于细胞色素 b 上 143 位的氨基酸为丙氨酸, 但其对哺乳动物的选择性机理尚不清楚。由于一些病原菌编码细胞色素 b 蛋白 G 143 的核苷酸序列 GGT 属于它们基因内含子剪切的识别位点, 因此这些病原菌中不能出

现由 G 143A 取代而引起的抗药性。Strobilurin 类杀菌剂可以诱导病原菌 AOX 的表达, 从而引起生理生化抗性的产生, 其中 ROS 在诱导的信号传递中起着重要的作用。而信号传递是否有 cAMP 和 MAPK 途径的参与尚需进一步研究确认。相信在不远的将来, 我们对 strobilurin 类杀菌剂的抗药性机理会有更深入和更全面的认识。

参考文献:

- [1] YAN Xiao-jing (闫晓静), JIN Shu-hui (金淑惠), CHEN Fu-heng (陈馥衡), et al. Strobilurin 类杀菌剂作用靶标的研究进展 [J]. Chin J Pestic Sci (农药学报), 2006, 8(4): 299-305
- [2] GISI U, SIEROTZKI H, COOK A, et al. Mechanisms Influencing the Evolution of Resistance to Q_o Inhibitor Fungicides [J]. Pest Manag Sci, 2002, 58: 850-867.
- [3] VON JAGOW G, ENGEL W D. Complete Inhibition of Electron Transfer from Ubiquinol to Cytochrome b by the

- Combined Action of Antinycin and Myxothiazol [J]. FEBS Lett, 1981, 136: 19-24.
- [4] TOMLIN C D S. The Pesticide Manual(13rd Edition) [M]. BCPC, British London, 2003
- [5] ZHANG L X, LI Z C, LI B, et al. SYP-Z07: A New Broad-spectrum Fungicide Candidate [C] // BCPC—Pests and Diseases 2003, 1: 93-98
- [6] Conclusion Regarding the Peer Review of the Pesticide Risk Assessment of the Active Substance Dinoxystrobin [J/OL]. EFSA Scientific Report 2005, 46: 1-82 <http://www.efsa.eu.int>
- [7] STAMMLER G, WATANABE A, HINO I et al. Oryastrobin: A Fungicide Innovation for Rice [C] // Abstracts 232nd ACS National Meeting, 2006.
- [8] FRAC Publications Pathogen Risk List [EB/OL]. [2005-12]. http://www.frac.info/frac/publication/anhang/FRAC_Pathogen_risk%20list.pdf
- [9] BARTLETT W D, CLOUGH J M, GODWIN J R, et al. The Strobilurin Fungicides [J]. Pest Manag Sci, 2002, 58: 649-662
- [10] LEADBEATER A, SIEROTZKI H, VARNEY P, et al. QoI Working Group of FRAC Minutes of the Meeting Cereals and Non-cereals November 27th and 28th, 2007 Organised by BASF at Schifferstadt Germany [EB/OL]. [2007-11]. <http://www.frac.info/frac/meeting/qoI2007.htm>
- [11] JORDAN D B, LIVINGSTON R S, BISAHA J J et al. Mode of Action Fenoxadone [J]. Pestic Sci, 1999(a), 55: 105-118.
- [12] NEUBURGER M, BEFFA R, VILLIER A. Mode of Action of Fenarimol: Similarities and Differences with Known QoI [J]. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer, 2003, 56(3): 449-464.
- [13] GISIU, CHN K M, KNAPOVA G, et al. Recent Developments in Elucidating Modes of Resistance to Phenylamide, DM I and Strobilurin Fungicides [J]. Crop Protection, 2000, 19: 863-872
- [14] WOOD P M, HOLLOMON D W. A Critical Evaluation of the Role of Alternative Oxidase in the Performance of Strobilurin and Related Fungicides Acting at Qo Site of Complex III [J]. Pest Manag Sci, 2003, 59: 499-511.
- [15] MA Z, MICHAELIDES T J. Advances in Understanding Molecular Mechanisms of Fungicide Resistance and Molecular Detection of Resistant Genotypes in Phytopathogenic Fungi [J]. Crop Protection, 2005, 24: 853-863.
- [16] RAGO J P, COPPEE J Y, COLSON A M. Molecular Basis for Resistance to Myxothiazol Mucidin (Strobilurin A), and Stigmatellin [J]. J Bio Chem, 1989, 264(24): 14543-14548.
- [17] KRAICZY P, HAASE U, GENCLER S, et al. The Molecular Basis for the Natural Resistance of the Cytochrome bc₁ Complex from Strobilurin-producing Basidiomycetes to Qo Inhibitors [J]. Eur J Biochem, 1996, 235: 54-63
- [18] ZOGAS B N, BALDWIN B C, YOUNG J E. Alternative Respiration: A Biochemical Mechanism of Resistance to Azoxystrobin (CIA 5504) in *Septoria tritici* [J]. Pestic Sci, 1997, 50: 28-34.
- [19] FRAC Publications Frac List of Plant Pathogenic Organisms Resistant to Disease Control Agents [EB/OL]. [2006-12]. http://www.frac.info/frac/publication/anhang/List_of_resistant_plant_pathogens_Dec%202006_web.pdf
- [20] CHN K M, CHAVALLAZ D, KAESBOHRER M, et al. Characterizing Resistance Risk of *Erysiphe graminis f. sp. tritici* to Strobilurins [J]. Crop Protection, 2001, 20: 87-96
- [21] LEADBEATER A, SIEROTZKI H, VARNEY P, et al. List of Pathogens with Field Resistance towards QoI Fungicides FRAC QoI Working Group [EB/OL]. [2007-11-28]. http://www.frac.info/frac/meeting/2007/Pathogens_with_field_resistance_towards_QoI_fungicides.pdf <http://www.frac.info/>
- [22] BERESFORD R, Pak H, BROWN G, et al. Strategies to Avoid Resistance Development to Strobilurin and Related Fungicides in New Zealand [C] // Proceedings of the New Zealand Plant Protection Conference 1999, 52: 179-181
- [23] M GUEZ M, REEVE C, WOOD P M, et al. Alternative Oxidase Reduces the Sensitivity of *Mycosphaerella graminicola* to QoI Fungicides [J]. Pest Manag Sci, 2003, 60: 3-7
- [24] ESPOSTIM D, VRIES S D, CRMIM, et al. Mitochondrial Cytochrome b Evolution and Structure of the Protein [J]. Biochim Biophys Acta, 1993, 1275: 61-69.
- [25] BRASSEUR G, SARBASAS, DALDAL F. A Compilation of Mutations Located in the Cytochrome b Subunit of the Bacterial and Mitochondrial bc₁ Complex [J]. Biochim Biophys Acta, 1996, 1275: 61-69.
- [26] LEADBEATER A, SIEROTZKI H, VARNEY P, et al. Mutations Associated with Qo Resistance. FRAC QoI Working Group [EB/OL]. [2006-12]. http://www.frac.info/frac/meeting/2007/Mutations_associated_with_QoI_resistance.pdf
- [27] BAÜMLER S, SIEROTZKI H, GISIU et al. Evaluation of *Erysiphe graminis f. sp. tritici* Field Isolates for Resistance to Strobilurin Fungicides with Different SNP Detection Systems [J]. Pest Manag Sci, 2003, 59: 310-314
- [28] SIEROTZKI H, FREY R, WULLSCHLEGER J et al. Cytochrome b Gene Sequence and Structure of *Pyrenophora teres* and *P. tritici-repentis* and Implications for QoI Resistance [J]. Pest Manag Sci, 2007, 63: 225-233
- [29] SIEROTZKI H, WULLSCHLEGER J G ISI U. Point mutation in Cytochrome b Gene Conferring Resistance to Strobilurin Fungicides in *Erysiphe graminis f. sp. tritici* Field Isolates [J]. Pestic Biochem Physiol, 2000, 68: 107-112.
- [30] MA Z, FELTS D, MICHAELIDES T J. Resistance to Azoxystrobin in *Alternaria* Isolates from Pistachio in California [J]. Pestic Biochem Physiol, 2003, 77: 66-74.
- [31] KIM Y S, DICKON E W, Vincelli P, et al. Field Resistance to Strobilurin (QoI) Fungicides in *Pyricularia grisea* Caused by Mutations in the Mitochondrial Cytochrome b Gene [J]. Phytopathology, 2003, 93: 891-900
- [32] XIA D, YU C A, KIM H, et al. Crystal Structure of the Cytochrome bc₁ Complex from Bovine Heart Mitochondria [J]. Science, 1997, 277: 60-66
- [33] WATA S, LEE J W, OKADA K, et al. Complete Structure of the 11-Subunit Bovine Mitochondrial Cytochrome bc₁ Complex [J]. Science, 1998, 281: 64-71

- [34] ZHANG Z, HUANG L, SHULMEISTER V M, et al Electron Transfer by Domain Movement in Cytochrome bc_1 [J]. Nature, 1998, 392: 677-684
- [35] HUNTE C, KOEIKE J, LANGE C, et al Structure at 2.3 $\text{\AA}$ Resolution of the Cytochrome bc_1 Complex from the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Co-crystallized with an Antibody Fv Fragment [J]. Structure, 2000, 8(6): 669-684.
- [36] LANGE C, HUNTE C. Crystal Structure of the Yeast Cytochrome bc_1 Complex with its Bound Substrate Cytochrome c [J]. Proc Natl Acad Sci, 2002, 99(5): 2800-2805
- [37] ZIEGLER H, BENET-BUCHHOLZ J, Etzel W, et al Trifluorostrobilurin—A New Strobilurin Fungicide with an Outstanding Biological Activity [J]. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer, 2003, 56: 213-230.
- [38] ESSER L, QUINN B, LI Y F, et al Crystallographic Studies of Quinol Oxidation Site Inhibitors A Modified Classification of Inhibitors for the Cytochrome bc_1 Complex [J]. J Mol Biol, 2004, 341: 281-302
- [39] SAUTER H, STEGLICH W, ANKE T. Strobilurins Evolution of a New Class of Active Substances [J]. Angew Chem Int Ed, 1999, 38: 1328-1349
- [40] GRASSO V, SIEROTZKI H, GARBALDI A, et al Characterization of the Cytochrome b Gene Fragment of *Puccinia* Species Responsible for the Binding Site of QoI Fungicides [J]. Pestic Biochem Physiol, 2006, 84: 72-82
- [41] GRASSO V, SIEROTZKI H, GARBALDI A, et al Cytochrome b Gene Structure and Consequences for Resistance to QoI Inhibitor Fungicides in Plant Pathogens [J]. Pest Manag Sci, 2006, 62: 465-472
- [42] ZHENG D, KÖLLER W. Characterization of the Mitochondrial Cytochrome b Gene from *Venturia inaequalis* [J]. Curr Genet, 1997, 32: 361-66
- [43] LAMBOWITZ A M, SLAYMAN C W. Cyanide Resistant Respiration in *Neurospora crassa* [J]. J Bacteriol, 1971, 108: 1087-1096.
- [44] JOSEPH-HORNE JT, HOLLOWOMON DW, WOOD PM. Fungal Respiration: A Fusion of Standard and Alternative Components [J]. Biochim Biophys Acta, 2001, 1504: 179-195.
- [45] GRASSO V. Characterization of the Cytochrome b Gene in Plant Pathogenic Basidiomycetes and Consequences for QoI Resistance [D]. Torino Turin University; Basel University of Basel 2005
- [46] OLAYA G, ZHENG D, KÖLLER W. Differential Responses of Germinating *Venturia inaequalis* Conidia to Kresoxim-methyl [J]. Pestic Sci, 1998, 54: 230-236
- [47] SCHNABEL G, JONES A L. Molecular Evidence for Activation of the Alternative Respiratory Pathway in *Venturia inaequalis* by Strobilurin Fungicides [C] // Dehne HW, Gisi U, Kuck KH, et al Modern Fungicides and Antifungal Compounds III. 2002: 161-165
- [48] SEDOW J N, MOORE A L. A Kinetic Model for the Regulation of Electron Transfer Through the Cyanide-resistant Pathway in Plant Mitochondria [J]. Biochim Biophys Acta, 1993, 1142: 165-174.
- [49] VAN DEN BERGEN C W M, WAGNER A M, KRAB K, et al A Relationship between Electron Flux and the Redox Poise of the Quinone Pool in Plant Mitochondria [J]. Eur J Biochem, 1994, 226: 1071-1078.
- [50] SIEROTZKI H, PARISI S, STENFELD U, et al Mode of Resistance to Respiration Inhibitors at the Cytochrome bc_1 Complex of *Mycosphaerella fijiensis* Field Isolates [J]. Pest Manag Sci, 2000, 56: 833-841.
- [51] M NAGAWA N, KOGA S, NAKANOB M, et al Possible Involvement of Superoxide Anion in the Induction of Cyanide-Resistant Respiration in *Hansenula anomala* [J]. FEBS Lett, 1992, 302: 217-219.
- [52] MIZUTANI A, MUKI N, YUKIOKA H, et al A Possible Mechanism of Control of Rice Blast Disease by a Novel Alkoxyiminodiacetamide Fungicide SSF126 [J]. Phytopathology, 1996, 86: 295-300
- [53] YUKIOKA H, NAGAKI S, TANAKA R, et al Transcriptional Activation of the Alternative Oxidase Gene of the Fungus *Magnaporthe grisea* by a Respiratory-inhibiting Fungicide and Hydrogen Peroxide [J]. Biochim Biophys Acta, 1998, 1142: 161-169.
- [54] JOSEPH-HORNE J T, WOOD P M, HEPPNER C, et al Involvement of the Alternative Oxidase in Cellular Energy Production in the Wheat 'Take All' Fungus *Gaeumannomyces graminis var tritici* [J]. Pestic Sci, 1999, 55: 343-389
- [55] HUANG Xiao-yuan (黄晓元), FAN Peng-jun (范鹏举), HUANG Yue-sheng (黄跃生). 缺氧感受和信号转导 [J]. China J Modern Medicine (中国现代医学杂志), 2004, 23: 39-52
- [56] XU Shu-cheng (许树成), DING Haidong (丁海东), SANG Jian-rong (桑建荣). 植物细胞活性氧种类、代谢及其信号转导 [J]. Acta Botanica Yunnanica (云南植物研究), 2007, 29(3): 55-365.
- [57] KIM J H, CAMPBELL B C, MAHONEY N, et al Targeting Antioxidative Signal Transduction and Stress Response System: Control of Pathogenic *Aspergillus* with Phenolics that Inhibit Mitochondrial Function [J]. J Appl Microbiol, 2006, 101(1): 181-189.
- [58] KIM J H, CAMPBELL B C, MAHONEY N, et al Enhanced Activity of Strobilurin and Fludioxonil by Using Berberine and Phenolic Compounds to Target Fungal Antioxidative Stress Response [J]. Lett Appl Microbiol, 2007, 45: 134-141
- [59] YOSHIIRO T, THOMAS B, ATSUSHIM, et al Spermine Signalling in Tobacco Activation of Mitogen-activated Protein Kinases by Spermine is Mediated through Mitochondrial Dysfunction [J]. Plant Journal, 2003, 36(6): 820-829

(Ed JIN SH)