

· 研究论文 ·

利用 HPLC 检测禾谷丝核菌菌丝对戊唑醇的吸收

夏晓明, 王开运*, 郭庆龙, 刘振龙, 胡燕, 崔淑华

(山东农业大学 植物保护学院 农药科学系, 山东 泰安 271018)

摘要:建立了禾谷丝核菌 *Rhizoctonia cerealis* 菌丝吸收戊唑醇的反相高效液相色谱 (HPLC) 检测方法, 样品经萃取净化后过 HPLC 检测, 外标法定量。方法的最小检出量和最低检出浓度分别为 0.2 ng 和 0.01 mg/kg。回收率及精密度高, 能满足真菌抗药性机制研究中定量分析的要求。与传统的液体闪烁计数法相比, 该方法成本低、简便、准确。同时, 比较了用戊唑醇处理后, 敏感菌株和不同抗性水平菌株对戊唑醇的吸收及药剂在菌株体内的积累情况。结果表明, 在 0.5 mg/L 剂量下, 戊唑醇在抗性菌株体内的积累浓度要小于在敏感菌株体内, 处理后 24 h, 敏感菌株体内戊唑醇的浓度要比高抗菌株高 127.74%, 比两个中抗菌株也分别高 47.72% 和 7.83%。

关键词: 高效液相色谱法; 禾谷丝核菌; 戊唑醇; 吸收; 抗药性

中图分类号: O657.72; S481.4

文献标识码: A

文章编号: 1008-7303(2006)01-0051-05

Determination of the Absorption of Tebuconazole by Mycelium of *Rhizoctonia cerealis* with High Performance Liquid Chromatography

XIA Xiaoming, WANG Kaiyun*, GUO Qinglong, LU Zhenlong, HU Yan, CUI Shuhua
(Department of Pesticide Science, College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

Abstract The quantitative analysis method of high performance liquid chromatography (HPLC) was established to determine the absorption of tebuconazole by mycelium of *Rhizoctonia cerealis*. After the sample was extracted and purified, it was determined by the HPLC and the external standard method was used. The minimum detectable amount and concentration were 0.2 ng and 0.01 mg/kg, respectively. The recovery and precision were high. It could completely satisfy with the demands of quantitative analysis on the study of drug-fast mechanism of fungi. The method has some merits including low cost, simple and accurate, compared with traditional liquid scintillation method. The comparison of the absorption of tebuconazole was made between resistant strains and sensitive strain. The results showed that after treated with tebuconazole (0.5 mg/L), the amount of tebuconazole accumulated by resistant strains was lower than that by sensitive strain. After 24 hours, the amount of tebuconazole accumulated by sensitive strain was 127.74% higher than that of high resistant strain, 47.72% and 7.83% higher than that of middle resistant strains, respectively.

Key words high performance liquid chromatography (HPLC); *Rhizoctonia cerealis*; tebuconazole; absorption; resistance

收稿日期: 2005-10-11; 修回日期: 2006-01-18.

作者简介: 夏晓明 (1978-), 男, 山东安丘人, 在读博士研究生, 主要从事农药毒理与有害生物抗药性研究; * 通讯作者: 王开运 (1954-), 男, 山东滕州人, 教授, 博士生导师, 主要从事农药毒理与有害生物抗药性研究. 联系电话: 0538-8242345; E-mail: kyw_ang@sdau.edu.cn

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目 (2002BA516A12).

小麦纹枯病由禾谷丝核菌 *Rhizoctonia cerealis* 引起, 又称小麦尖眼斑病 (Wheat sharp eyespot), 是一种在世界各地小麦上广泛发生、分布的土传真菌病害^[1], 该病害现已成为影响我国小麦高产稳产的重大障碍^[2,3]。戊唑醇是德国拜耳公司于 20 世纪 80 年代开发的一种三唑类杀菌剂, 属于麦角甾醇合成抑制剂, 对小麦纹枯病具有很好的防治效果。但目前该药剂的田间防效已明显下降, 室内研究也发现, 禾谷丝核菌对该药的抗性风险性较大^[4,5]。

植物病原菌对杀菌剂的抗性已成为当前控制植物病害过程中所面临的最突出问题^[6]。为了克服这一难题, 人们在植物病原菌对杀菌剂产生抗药性的原因和抗性机制方面进行了大量的研究, 已证明菌丝体对药剂吸收能力的降低或药剂在菌丝体内积累减少是许多真菌对杀菌剂产生抗性的主要原因之一^[7-9]。通常采用液体闪烁计数器结合同位素标记法来研究菌丝体对药剂的吸收与积累。在含有定量新鲜菌丝的液体培养基中, 加入用同位素标记过的药剂, 振荡培养一段时间, 去除菌丝, 用液体闪烁计数器测定液体培养基中药剂的量, 就可以得到菌丝吸收药剂的量^[7]。液体闪烁计数器价格比较昂贵, 获得同位素标记的材料难度较大, 且安全性较差。为此, 笔者选择了反相高效液相色谱法 (HPLC) 代替同位素标记法来进行定量。以获得的抗戊唑醇的禾谷丝核菌突变菌株为材料, 测定并比较了抗性与敏感菌株对戊唑醇的吸收和积累, 用以分析其可能的抗性机制。该方法简单、安全、准确, 可为真菌的抗药性机制研究提供了一种新的思路。

1 材料与方 法

1.1 试剂和仪器

Waters 公司高效液相色谱仪, 具有可变波长紫外检测器; 岛津 C-R6A 色谱数据处理机; KQ-500D B 型数控超声波清洗器 (昆山市定山湖检测仪器厂); UV-2201 紫外分光光度计 (日本岛津)。已知纯度 $\geq 99.0\%$ 的戊唑醇 (tebuconazole) 标准品 (山东华阳科技股份有限公司提供), 用丙酮溶解, 配成 $1\ 000\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 的戊唑醇母液, 然后用重蒸水稀释至各所需浓度。甲醇为色谱纯; 二氯甲烷 (分析纯, 经重蒸); 无水硫酸钠为分析纯; 弗罗里硅土 (60~100 目, Caledon 分装, 先参照文献

[10] 进行活化, 用前用质量分数为 5% 的水脱活); 活性炭 (化学纯, 120~220 目, 先用浓 HCl 煮沸 1.5~2.0 h 然后用蒸馏水洗至中性, 130°C 下干燥备用^[11])。

1.2 供试菌株

供试亲本敏感菌株 (S 菌株): 从泰山中天门发病的狗尾草上分离后接种到温室盆栽小麦上, 再从发病植株上分离纯化, 经分离鉴定确定为禾谷丝核菌 *Rhizoctonia cerealis*, 从未使用过化学药剂, EC_{50} 值为 $0.012\ 0\ \mu\text{g}/\text{mL}$, 敏感度较高。WWL 为药剂连续选择获得的高抗菌株, EC_{50} 值为 $0.400\ 4\ \mu\text{g}/\text{mL}$; WX1、WX2 为 UV 诱导获得的中抗菌株, EC_{50} 值分别为 $0.122\ 6$ 和 $0.377\ 5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ^[7]。

1.3 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA): 马铃薯 200 g 葡萄糖 200 g 琼脂 20 g 去离子水 1 000 mL, 用于病原菌的分离、保存和毒力测定。马铃薯葡萄糖培养基 (PD): 马铃薯 200 g 葡萄糖 200 g 去离子水 1 000 mL, 用于病原菌的液体培养。

1.4 样品的制备和测定方法

1.4.1 样品的制备 将供试菌株在 PDA 培养基上、 25°C 培养 4 d 后, 制成直径 5 mm 的菌碟 (以下简称菌碟), 分别接入 PD 培养液中, 振荡 (120 r/min) 培养 3 d 后取菌丝备用。新鲜菌丝用重蒸水冲洗, 真空抽滤后称取菌丝鲜重 2 g 重新悬浮于含一定浓度戊唑醇的 PD 液体培养液中, 25°C 下振荡培养。

将上述含有一定浓度戊唑醇的菌丝悬浮液振荡培养一定时间后, 抽滤, 并用 50 mL 二氯甲烷洗涤菌丝 3 次。合并滤液并转移到 250 mL 分液漏斗中, 依次用 40、30、30 mL 二氯甲烷萃取。收集二氯甲烷相于浓缩瓶中, 在 40°C 水浴下旋转蒸发浓缩至约 5 mL 待净化。

在 $30\ \text{cm} \times 2\ \text{cm}$ 玻璃柱中放入洁净并经处理的脱脂棉, 从下至上依次装入 2 cm 左右的无水硫酸钠、5.0 g 弗罗里硅土-活性炭 (50:1, 质量比)、2 cm 高的无水硫酸钠。先用 40 mL 二氯甲烷淋洗柱子, 待二氯甲烷流至接近无水硫酸钠表面时, 将样品浓缩液转移至柱中, 用 60 mL 二氯甲烷-甲醇 (90:10 体积比) 淋洗。收集淋洗液, 于 40°C 水浴下旋转蒸发浓缩近干后, 用 10 mL 甲醇定容待测。

1.4.2 HPLC 测定条件 色谱柱: DiamonsilTM C₁₈ 柱, $250\ \text{mm} \times 4.6\ \text{mm}$ (id), $5\ \mu\text{m}$; 流动相: 甲醇-水

(70:30, 体积比); 紫外检测器检测波长: 225 nm; 柱温: 室温; 流速: 0.8 mL/min; 进样量: 20 μ L; 保留时间: 24 min。

1.4.3 回收率、精密度及最低检测限试验 在不加菌丝的空白 PD 培养液中分别加入 5.00、0.50、0.10 mg/L 的戊唑醇标准品, 按照上述样品的制备和测定步骤, 进行添加回收率试验, 每个浓度重复 3 次。

分别取 3 个浓度的标准品溶液, 每隔 3 h 测定一次峰面积, 共做 6 次, 根据 6 次的测定结果计算日内精密度; 隔日测定一次峰面积, 共做 4 次, 根据 4 次的测定结果计算日间精密度。

取戊唑醇的标准溶液不断成倍稀释, 稀释一次进样 20 μ L, 当戊唑醇的检测信号为 3 倍噪音信号时, 停止稀释, 并根据此时的进样量确定戊唑醇的最小检出量并计算最低检出浓度。

1.5 抗药突变体对戊唑醇吸收的测定

按照 1.4 的方法取 2 g 不同抗性水平菌株新鲜菌丝体重新悬浮于 49 mL PD 培养基中, 加入 1 mL 浓度为 25 mg/L 的戊唑醇, 使戊唑醇浓度为 0.5 mg/L, 于 25 $^{\circ}$ C 下振荡培养。分别在刚加药及加药后 0.5、1、2、6、24 h 时各取 3 份菌丝悬浮液 (每 50 mL 作为 1 份, 每个菌株每一时间处理

3 份), 测定禾谷丝核菌对戊唑醇的吸收随时间变化的情况。以不加菌丝的含药 PD 培养液为对照, 每个处理重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 样品的制备和测定

本研究选择反相高效液相色谱法代替同位素标记法进行定量, 用以测定禾谷丝核菌对戊唑醇的吸收。结果表明, 戊唑醇浓度在 0.05~10.00 mg/L 范围内, 药剂浓度与峰面积呈良好的线性关系, 其标准曲线方程为 $Y = 9.6059x - 216.5$, 相关系数 $r = 0.9981$ 。样品及标样色谱图见图 1, 可清楚地看到样品的净化效果较好, 样品和杂质可以达到理想的分离效果, 且柱效和峰型良好, 能满足检测要求。

回收率及精密度测定结果 (表 1) 也表明, 样品的平均添加回收率为 97.1%~99.6%, 相对标准偏差为 2.1%~5.3%; 日内精密度为 2.8%~4.9%, 日间精密度为 7.2%~9.8%。最小检出量为 0.2 ng, 最低检出浓度为 0.01 mg/kg, 均能满足定量要求。

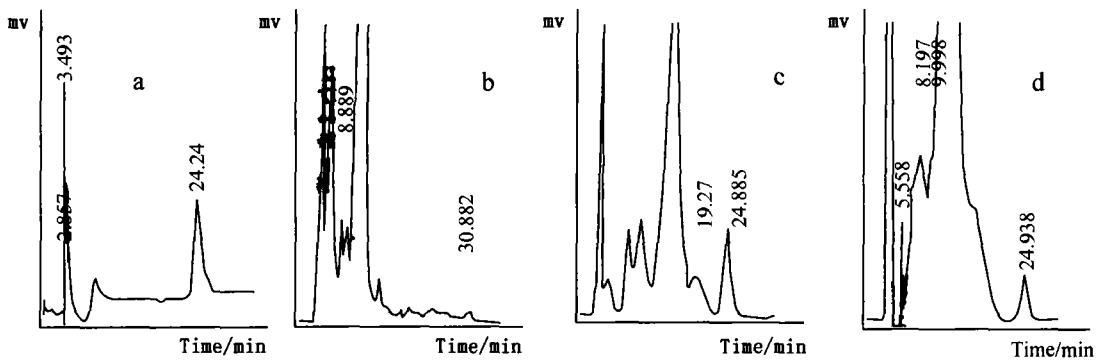


Fig 1 Chromatogram of standard and samples

a standard b blank c fortified sample d mycelium sample

Note: The peak on 24 min represents tebuconazole

Table 1 The results of recoveries and precision

Concentration/mg \cdot L ⁻¹	Recoveries(%)	RSD (%)	Intra-day RSD (%)	Inter-day RSD (%)
5.00	98.7	2.1	2.8	7.2
0.50	97.1	4.4	3.5	8.6
0.10	99.6	5.3	4.9	9.8

2.2 抗药突变体对戊唑醇的吸收

对不同抗性水平菌株的测定结果 (图 2) 表明,

当用浓度为 0.50 mg/L 的戊唑醇处理后, 各菌株对戊唑醇的吸收与积累均呈现先迅速增加后迅速

下降、然后又增加的趋势。

用戊唑醇处理后 0.5 h 内, 抗性菌株与敏感菌株对戊唑醇的吸收速率相似, 到 0.5 h 各菌株对戊唑醇的吸收与积累均达到一个明显的高峰, 此时吸收速度大于排泄速度, 药剂在菌体内的积累呈明显上升趋势。此后, 药剂的排泄速度加快, 在各菌株体内的积累开始下降, 并在处理后 2 h 降到最低值, 此时菌体对药剂的吸收与排泄达到平衡。但敏感菌株对戊唑醇的吸收和积累量要稍高于抗性菌株, 这可能是由于抗性菌株的排泄速度大于敏感菌株所致。处理后 2 h, 各菌株对戊唑醇的吸收与积累又呈明显上升趋势, 至 24 h 敏感菌株体内戊唑醇的浓度要比高抗菌株高 127.74%, 比两个中抗菌株也分别高 47.72% 和 7.83%。表明敏感菌株对戊唑醇的吸收和积累速度要明显高于抗性菌株。

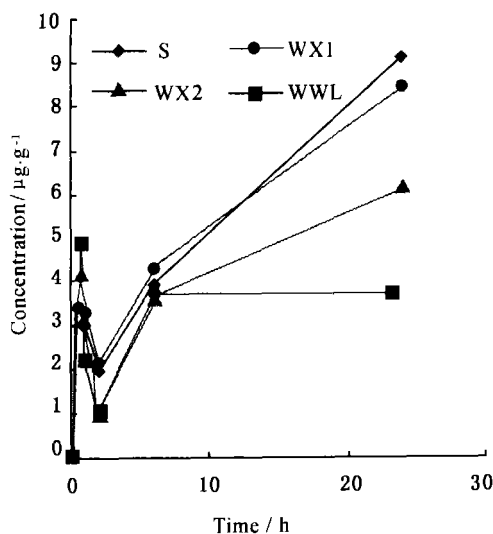


Fig 2 Absorption and accumulation in different resistance level of *Rhizoctonia cerealis* to tebuconazole

3 讨论

在样品的制备过程中, 作者测定了戊唑醇的淋洗曲线, 确定采用 60 mL 洗脱液进行洗脱, 不仅可节省部分溶剂, 还可节省淋洗时间。本研究净化的样品是马铃薯葡萄糖液体培养基, 杂质主要是淀粉、糖和少量的叶黄素。通过研究发现, 采用 5.0 g 弗罗里硅土-活性炭 (50:1, 质量比) 作为净化柱填充材料, 二氯甲烷-甲醇 (90:10, 体积比) 作为淋洗液时, 回收率和净化效果都很好。

目前, 在研究菌丝体对药剂的吸收时, 尚未见采用色谱法定量的报道。本研究通过 HPLC 法定量检测禾谷丝核菌对戊唑醇的吸收, 结果发现, 当药剂添加浓度在 0.10~5.00 mg/L 时, 回收率可达 97.1%~99.6%, 最小检出量与最低检出浓度分别为 0.2 ng 和 0.01 mg/kg, 可以满足定量分析的要求。根据培养液中药剂的原始加入量及处理后检测到的药剂量就可以得到菌丝对药剂的吸收量。由此说明在抗药性机制研究中, 可以用色谱法代替液体闪烁计数法来进行定量, 但针对其他药剂和病原真菌时, 其色谱条件和样品制备过程还应另加探讨。

许多研究表明, 真菌对三唑类杀菌剂的抗性是因为其细胞内三唑类药剂浓度的改变而引起的, 例如 *Candida albicans*^[12]、*Cryptococcus neoformans*^[13] 和 *Penicillium italicum*^[14], 并且这些抗药突变体对其他三唑类药剂具有交互抗药性。Joseph-Home 等^[15] 研究发现, *Septoria tritici* 对三唑类药剂产生抗性最根本的机制是由于药剂在真菌细胞内积累的减少, 而造成积累减少的原因很可能是对药剂的吸收减少或者是排泄增加。周明国等^[7] 研究也表明, *N. crassa* 对三唑醇的抗性机制是突变体加强了对三唑醇的排泄作用, 降低了药剂在体细胞内的积累。用 2.5 μg/mL 同等剂量的三唑醇处理抗性突变体和敏感菌株 2 h 后, 突变菌株体内的实际药剂浓度比敏感菌株低 56.1%。作者等^[5] 研究也发现, 抗戊唑醇突变体与敏感菌株相比, 能在较短的时间里更快速地将杀菌剂排出体外。

本研究表明, 用戊唑醇处理后, 在相同的处理剂量下, 戊唑醇在抗性菌株体内的积累浓度要明显低于在敏感菌株体内, 从而降低了药剂对菌体的实际作用浓度, 表现出抗药性。而造成积累减少的原因是否与药剂的吸收减少或者是排泄增加有关, 还需要进一步研究证明。

参考文献:

- [1] Wachowska U. Susceptibility of cereals and other crops to *Rhizoctonia cerealis* [J]. *Phytopathologia Polonica*, 2000 (20): 59-66.
- [2] WANG Yu-zheng (王玉正), YUAN Yong-lan (原永兰), ZHAO Bai-ling (赵百灵), et al. 山东省小麦纹枯病为害损失及防治指标的研究 [J]. *Acta Phytophylacica Sinica* (植物保护学报), 1997, 24(1): 44-47.
- [3] WANG Yu-zhong (王裕中), WU Zhi-feng (吴志凤), SHI Jian-rong (史建荣), et al. 江苏省小麦纹枯病发生规律与病

- 害消长因素分析 [J]. *Acta Phytophylacica Sinica* (植物保护学报), 1994 21(2): 109-114.
- [4] LU Y ing-hua (刘英华), WANG Kai-yun (王开运), JIANG X ing-yin (姜兴印), et al. 禾谷丝核菌对戊唑醇的抗性及其抗药性菌系生物学特性 [J]. *Acta Phytophylacica Sinica* (植物保护学报), 2003 30(4): 423-428.
- [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其相对渗透率变化研究 [J]. *Chin J Pestic Sci* (农药学报), 2005, 7(2): 126-130.
- [6] De Waard M A, Van Nistelrooy J G M. Antagonistic and synergistic activities of various chemicals on the toxicity of fenarimol to *Aspergillus nidulans* [J]. *Pestic Sci* 1982 13(3): 279-286.
- [7] ZHOU Ming-guo (周明国), Hollomon D W. *Neurospora crassa* 对三唑醇的抗药性分子机制 [J]. *Acta Phytopathologica Sinica* (植物病理学报), 1997, 27(3): 275-280.
- [8] De Waard M A, Van Nistelrooy J G M. Differential accumulation of fenarimol by a wild-type isolate and fenarimol-resistant isolates of *Penicillium italicum* [J]. *Neth J Pl Pathol*, 1984(40): 143-153.
- [9] YANG Qian (杨谦). *Molecular Biology of Resistance of Plant Pathogen to Fungicide* (植物病原菌抗药性分子生物学) [M]. Beijing (北京): Scientific Publishers (科学出版社), 2003.
- [10] FAN De-fang (樊德方). *Analysis and Determination of Pesticide Residue* (农药残留量分析与检测) [M]. Shanghai (上海): Shanghai Scientific and Technical Publishers (上海科技出版社), 1982.
- [11] Import and Export Commodity Inspection Bureau of The Peoples Republic of China (中华人民共和国国家进出口商品检验检疫局). *The GC Method of Pesticide Residue* (农药残留量气相色谱法) [M]. Beijing (北京): Economic Commerce Publishers (对外经济贸易出版社), 1986.
- [12] Hitchcock C A. Resistance of *Candida albicans* to azole antifungal agents [J]. *Biochem Soc Trans*, 1993, (21): 1039-1047.
- [13] Joseph-Home T, Hollomon D, Loeffler R S T, et al. Crossresistance to polyene and azole drugs in *Cryptococcus neoformans* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995, (39): 1526-1529.
- [14] Guan J, Kapteyn J C, Kerkenaar A, et al. Characterisation of energy dependent efflux of imazalil and fenarimol in isolates of *Penicillium italicum* with a low, medium and high degree of resistance to DMF-fungicides [J]. *Neth J Plant Pathol*, 1992 (98): 313-324.
- [15] Joseph-Home T, Hollomon D, Manning N, et al. Investigation of the sterol composition and azole resistance in field isolates of *Septoria tritici* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, (62): 184-190.

(Ed. TANG J)