

抗丙烷脒番茄灰霉病菌渗透压敏感性 及线粒体复合酶Ⅲ活性的变化

侯 军,高亚楠,马志卿,冯俊涛,张 兴

(西北农林科技大学 无公害农药研究服务中心/陕西省生物农药工程技术研究中心,陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】初步阐明番茄灰霉病菌抗丙烷脒的生理生化机制。【方法】以药剂连续选择获得的抗丙烷脒番茄灰霉病菌菌株和敏感菌株为研究材料,测定了抗药突变体的渗透压敏感性和线粒体复合酶Ⅲ活性的变化。【结果】敏感菌株对低渗透压和高渗透压均表现敏感,低抗菌株仅对低渗透压敏感,中抗菌株对低渗透压和高渗透压均不敏感。在离体条件下,丙烷脒对敏感和抗性菌株线粒体复合酶Ⅲ活性无明显影响;在活体条件下,丙烷脒处理对敏感菌株线粒体复合酶Ⅲ的活性有明显抑制作用,而对抗性菌株没有明显影响。【结论】渗透压敏感性下降和线粒体复合酶Ⅲ活性的改变,可能是番茄灰霉病菌对丙烷脒产生抗药性的主要原因。

【关键词】 番茄灰霉病菌;丙烷脒;渗透压;线粒体复合酶Ⅲ

【中图分类号】 S436.412.1⁺3

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)04-0138-05

Changes of osmolarity sensitivity and mitochondrial complex Ⅲ activity of propamidine-resistance isolates of *Botrytis cinerea*

HOU Jun,GAO Ya-nan,MA Zhi-qing,FENG Jun-tao,ZHANG Xing

(Research and Development Center of Biorational Pesticides,Northwest A&F University/Biopesticide
Engineering Research Center,Shaanxi Province,Yangling,Shaanxi 712100,China)

Abstract: 【Objective】Physiological and biochemical mechanism of *Botrytis cinerea* resistance to propamidine was clarified preliminarily. 【Method】Propamidine-resistance strains of *B. cinerea*, which were used for testing osmolarity sensitivity and the activity of mitochondrial complex Ⅲ, were obtained by continuous selection of propamidine. 【Result】Sensitive strain was sensitive against low and high osmolarity. And, LR (low resistance) strain was sensitive against low osmolarity only. Besides, MR (moderate resistance) strain possessed no sensitivity against both low and high osmolarity. Propamidine had no effect on both sensitive strain and resistance-strains during the test of post-treatment on mitochondrial complex Ⅲ activity. However, during the pre-treatment activity test, propamidine possessed obvious inhibition on sensitive strains and had no significant effect on resistance-strains. 【Conclusion】Descending of osmolarity sensitivity and changes of activity on mitochondrial complex Ⅲ might be the main factor for the resistance development of *B. cinerea* to propamidine.

Key words: *Botrytis cinerea*; propamidine; osmolarity; mitochondrial complex Ⅲ

番茄灰霉病(*Botrytis cinerea* Pers.)是温室番茄生产中的主要病害之一,危害番茄的茎、叶、花、果

* [收稿日期] 2009-12-17

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30771442);教育部高等学校博士点基金项目(20070712003)

[作者简介] 侯 军(1979—),男,陕西三原人,在读博士,主要从事农药毒理学研究。E-mail:houjunn0629@yahoo.com.cn

[通信作者] 张 兴(1952—),男,陕西周至人,教授,博士生导师,主要从事植物化学保护和农药学研究。

E-mail:zhxing1952@126.com

实等,会造成严重的减产甚至绝收^[1]。灰霉病菌繁殖速度快,遗传变异大,易产生抗药性,已被 FRAC 确定为高抗药性风险的病原菌^[2]。目前,国内外关于灰霉病菌对多菌灵、乙霉威、腐霉利、啞霉胺、啞菌酯等杀菌剂的抗性已有大量报道^[3-7]。丙烷脒(pro-pamidine)是西北农林科技大学无公害农药研究服务中心研制的一种新型芳香二脒类内吸性杀菌剂,化学名称为 1,3-二(4-脒基苯氧基)丙烷,主要用于防治蔬菜、果树等经济作物上由番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)引起的灰霉病,兼有保护和治疗作用^[8]。夏晓明等^[9]研究发现,抗戊唑醇的禾谷丝核菌(*Rhizoctonia cerealis*)菌株对渗透压的敏感性明显低于敏感菌株,认为禾谷丝核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。吴方丽^[10]研究发现,丙烷脒可破坏细胞膜的完整性,对活体条件下线粒体呼吸链复合酶Ⅲ的活性有明显抑制作用,推断丙烷脒可能是通过与编码线粒体复合酶Ⅲ某个亚基的基因结合而起作用。基于此,本试验以通过丙烷脒诱导获得的抗药突变体为研究材料,从渗透压敏感性和线粒体复合酶Ⅲ活性变化 2 个方面,初步探讨番茄灰霉病菌对丙烷脒产生抗药性的生理生化机制,以期能为药剂抗性的分子机制研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 供试敏感菌株 091(S),从陕西杨凌未使用过丙烷脒的番茄植株上分离获得,经鉴定确定为番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*);使用丙烷脒连续选择获得的低抗菌株 F091-14(LR),以及使用丙烷脒连续选择获得的中抗菌株 F091-16(MR),均由西北农林科技大学无公害农药研究服务中心提供。

1.1.2 供试药剂 丙烷脒原药,纯度>95%,由西北农林科技大学无公害农药研究服务中心提供;细胞色素 C(Cytochrom C from *Saccharomyces cerevisiae*)、氧化型辅酶 Q(Ubiquinol-10, CoQ10)购自 Sigma 公司,均为分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 抗药突变体渗透压敏感性的测定 将番茄灰霉病菌菌株接种于 PDA 培养基上,23 ℃培养 3 d 后,用打孔器在菌落边缘打取直径 4 mm 的菌碟,接种到含有 10, 20, 40, 80, 120 g/L 葡萄糖的 PDA 培养基上,23 ℃培养 3 d 后用十字交叉法测量菌落直

径。每处理重复 4 次。

1.2.2 抗药突变体线粒体复合酶Ⅲ离体活性的测定 (1)菌丝体的制备。将番茄灰霉病菌接种在 PDA 培养基上,23 ℃下培养 10 d,用无菌水洗下孢子,制成孢子悬浮液,并用血球计数板将密度调至 1×10^6 mL⁻¹。将 0.1 mL 孢子悬浮液转入 100 mL PD 培养基中,于 23 ℃、120 r/min 条件下培养至番茄灰霉病菌呈对数生长期时,用无菌纱布过滤菌丝体,用无菌水洗涤 3 次获得菌丝样品,置于-70 ℃冰箱备用。

(2)线粒体的提取。将制得的菌丝体置于液氮中研磨匀浆,用 5 倍体积的线粒体提取缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl、50 mmol/L EDTA、100 g/L 蔗糖, pH 8.0)悬浮,4 ℃、750 g 离心 10 min,取上清液,4 ℃、8 000 g 离心 20 min,弃上清液取沉淀,将沉淀洗涤 2 次后,用考马斯亮蓝 G250 法测定蛋白含量,并将蛋白质量浓度调至 0.5 mg/mL 备用。

(3)还原型辅酶 Q 的制备。参考熊杰等^[11]的方法并略作变动。将 10 μmol CoQ10 完全溶解于 2 mL 四氢呋喃中,加入 1 mg NaBH₄,反复吹打至溶液由黄色变为无色,再加入 2 mL 无水乙醚,用氮气吹干,将所得黄色粉末溶于 1 mL 四氢呋喃和乙醇的混合液(V(四氢呋喃):V(乙醇)=1:1)中,获得 10 mmol/L 还原型辅酶 Q 备用,临用前以 1 mmol/L HCl 酸化后使用。

(4)活性的测定。将 5~10 μg 线粒体蛋白加入测定缓冲液(35 mmol/L K₂HPO₄、5 mmol/L MgCl₂、2 mmol/L NaN₃、0.5 mmol/L EDTA、35 μmol/L 细胞色素 C)中,25 ℃条件下分别与 0 (CK)、0.5、1、5 μg/mL 丙烷脒孵育 5 min 后,加入 100 μmol/L 还原型辅酶 Q 启动反应,10 min 内测定 550 nm 处细胞色素 C 的吸光值,每处理重复测定 4 次。按下式计算线粒体复合酶Ⅲ的活性 RI:

$$RI = (\Delta A \times V_t) / (\xi \times b \times V_s \times C)$$

式中:RI 为线粒体复合酶Ⅲ活性(nmol/(mg·min)),ΔA 为每分钟吸光值的变化值;V_t 为反应体系总体积,ξ 为细胞色素 C 的摩尔消光系数(19.1 L/(mmol·cm)),b 为光程,V_s 为加入样品蛋白的体积,C 为样品蛋白浓度。

1.2.3 抗药突变体线粒体复合酶Ⅲ活体活性的测定 (1)菌丝体的制备。将番茄灰霉病菌接种到 PDA 培养基上,23 ℃下培养 10 d,用无菌水洗下孢子,制成孢子悬浮液,并用血球计数板将密度调至 1×10^6 mL⁻¹。将 0.1 mL 孢子悬浮液转入 100 mL

PD 培养基中,于 23 ℃、120 r/min 条件下培养至番茄灰霉病菌孢子萌发出芽管后,分别加入不同质量浓度的(0(CK),0.5,1,5 μg/mL)丙烷脒,继续培养 1 和 3 d 后,用无菌纱布过滤菌丝体,用无菌水洗涤 3 次获得菌丝样品,置于-70 ℃冰箱备用。

(2)线粒体的提取。线粒体的提取方法同1.2.2(2)。

(3)还原型辅酶 Q 的制备。还原型辅酶 Q 的制备方法同 1.2.2(3)。

(4)活性的测定。将 5~10 μg 线粒体蛋白加入测定缓冲液中,于 25 ℃条件下孵育 5 min 后加入 100 μmol/L 还原型辅酶 Q 启动反应,10 min 内测定 550 nm 处细胞色素 C 的吸光值,计算线粒体复合酶Ⅲ的活性,计算公式同 1.2.2(4)。

2 结果与分析

2.1 抗丙烷脒番茄灰霉病菌对渗透压的敏感性

不同渗透压环境对抗性菌株和敏感菌株生长的影响见图 1。

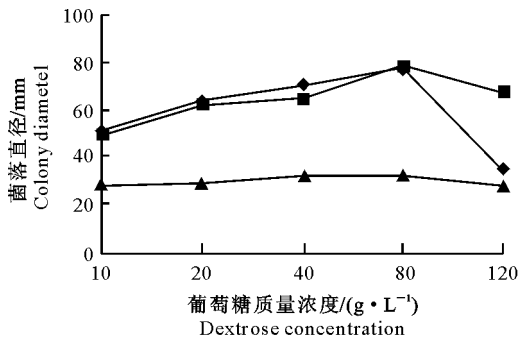


图 1 抗性菌株和敏感菌株对不同渗透压的反应
—◆—,091(S);—■—,F091-14(LR);—▲—,F091-16(MR)
Fig.1 Response of propamidine-resistant mutants and parent isolates to the osmolarity

由图 1 可以看出,葡萄糖质量浓度小于 80 g/L 时,091(S)和 F091-14(LR)的菌落直径均随葡萄糖质量浓度的增加而变大;但当葡萄糖质量浓度超过 80 g/L 时,091(S)的菌落直径随葡萄糖质量浓度的增加迅速变小,F091-14(LR)的菌落直径虽然也随葡萄糖质量浓度的增加而有所变小,但其变化幅度明显小于敏感菌株 091(S)。在葡萄糖质量浓度为 10~120 g/L 时,F091-16(MR)的菌落直径变化较小。可见,敏感菌株对低渗透压和高渗透压均较为敏感,低抗菌株仅对低渗透压敏感,而中抗菌株对低渗透压和高渗透压均不敏感。当葡萄糖质量浓度为 10~120 g/L 时,与敏感菌株相比,中抗菌株的菌落直径明显降低,这与其适合度的下降有关。

2.2 丙烷脒对离体条件下番茄灰霉病菌线粒体复合酶Ⅲ活性的影响

丙烷脒对离体条件下番茄灰霉病菌线粒体复合酶Ⅲ活性的影响见表 1。由表 1 可知,在各供试丙烷脒质量浓度下,敏感菌株和抗性菌株的线粒体复合酶Ⅲ活性与对照相比均变化不大,经 Duncan 氏新复极差检验,其在 $P_{0.05}$ 水平上差异不显著。由此可见,丙烷脒对离体条件下敏感菌株和抗性菌株线粒体复合酶Ⅲ的活性均无影响。

表 1 丙烷脒对离体条件下番茄灰霉病菌线粒体复合酶Ⅲ活性的影响
Table 1 Effect of propamidine post-treatment on the activity of mitochondrial complex Ⅲ in *Botrytis cinerea*
nmol/(mg · min)

丙烷脒质量浓度/ (μg · mL ⁻¹) Treatment	091(S)	F091-14(LR)	F091-16(MR)
0.5	29.4±1.0	23.4±1.1	23.3±1.1
1	28.2±1.4	21.9±1.1	23.1±0.5
5	27.7±0.8	21.5±1.0	22.8±0.5
0(CK)	30.0±1.6	22.7±0.8	23.9±1.7

注:表中数据为 4 次重复的“平均值±标准差”。各菌株在不同质量浓度丙烷脒处理下的线粒体复合酶Ⅲ的活性,经 Duncan 氏新复极差测验在 $P_{0.05}$ 水平上差异均不显著。
Note:Data are given as mean ± SD from 4 duplications. Mitochondrial complex Ⅲ activity of each strain treated by different concentraion of propamidine show no significant difference at $P_{0.05}$ by Duncan's multiple range test.

2.3 丙烷脒对活体条件下番茄灰霉病菌线粒体复合酶Ⅲ活性的影响

丙烷脒对活体条件下番茄灰霉病菌线粒体复合酶Ⅲ活性的影响见表 2 和表 3。

表 2 丙烷脒对活体条件下番茄灰霉病菌线粒体复合酶Ⅲ活性的影响(1 d)
Table 2 Effect of propamidine pre-treatment on the activity of mitochondrial complex Ⅲ in *Botrytis cinerea* (1 d)
nmol/(mg · min)

丙烷脒质量浓度/ (μg · mL ⁻¹) Treatment	091(S)	F091-14(LR)	F091-16(MR)
0.5	26.3±1.2 b	27.2±1.5 a	28.6±1.2 a
1	24.4±1.1 b	26.9±1.3 a	29.0±1.9 a
5	13.8±1.0 c	25.4±1.5 ab	26.5±1.9 a
0(CK)	30.0±2.9 a	24.2±1.0 b	25.8±2.4 a

注:表中数据为 4 次重复的“平均值±标准差”。同列数据后标有不同字母者表示经 Duncan 氏新复极差测验在 $P_{0.05}$ 水平上差异显著。下表同。
Note:Data are given as mean ± SD from 4 duplications. Data within a column followed by different letters show significant difference at $P_{0.05}$ by Duncan's multiple range test. The same below.

表 3 丙烷脒对活体条件下番茄灰霉病菌线粒体复合酶Ⅲ活性的影响(3 d)

Table 3 Effect of propamidine pre-treatment on the activity of mitochondrial complex Ⅲ in *Botrytis cinerea* (3 d)

丙烷脒质量浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) Treatment	nmol/(mg · min)		
	091(S)	F091-14(LR)	F091-16(MR)
0.5	21.1±1.2 b	25.0±1.3 a	26.3±1.0 a
1	20.3±0.8 b	25.6±2.9 a	26.1±0.5 a
5	9.7±1.1 c	24.5±2.0 a	24.1±1.9 a
0(CK)	26.7±2.0 a	23.0±1.3 a	24.9±1.6 a

由表 2 和表 3 可以看出,在活体条件下,不同质量浓度丙烷脒处理对番茄灰霉病菌敏感菌株线粒体复合酶Ⅲ活性具有明显的抑制作用,且随着丙烷脒质量浓度的提高,对线粒体复合酶Ⅲ的抑制作用逐渐增强,处理 1 和 3 d 后,各质量浓度丙烷脒处理的线粒体复合酶Ⅲ活性与同期对照相比均差异显著;在处理 1,3 d 后,不同质量浓度丙烷脒处理对活体条件下番茄灰霉病菌抗性菌株线粒体复合酶Ⅲ的活性没有明显影响。

3 结论与讨论

渗透压敏感性下降可能是番茄灰霉病菌对丙烷脒产生抗药性的重要因素之一。微生物在高渗透压环境的胁迫下,大多可以合成或从环境中吸收一些低分子质量的物质,来调节自身的渗透压以平衡外界渗透压的增高^[12]。张永杰等^[13]比较了灰霉病菌高抗腐霉利菌株和敏感菌株对渗透压的敏感性,发现抗性菌株对渗透压更敏感。而本研究发现,番茄灰霉病菌敏感菌株对低渗透压和高渗透压均表现敏感,低抗菌株仅对低渗透压敏感,中抗菌株对低渗透压和高渗透压均不敏感,说明抗性菌株的渗透调节能力要大于敏感菌株,这与张永杰等^[13]的研究结果有所不同,其原因可能是由于灰霉病菌对腐霉利和丙烷脒产生抗性的机理不同所致。Ellis 等^[14]认为,菌体在高渗透压环境中需要不断合成甘油,来维持细胞膨压而消耗大量能量,故生长受到抑制甚至不能生长,渗透压突变和抗药性突变可能是同源的。结合丙烷脒对番茄灰霉病菌的电镜观察结果^[8],综合分析认为,抗性菌株渗透压敏感性下降,导致膜透性降低,使药物分子难以穿过细胞膜进入菌丝体内,从而表现出一一定的抗药性。

线粒体复合酶Ⅲ活性的改变可能是番茄灰霉病菌对丙烷脒产生抗药性的重要因素之一。线粒体是真核细胞能量转换的主要场所,也是对许多外来化

合物最敏感、最早受到累及的靶点^[15]。线粒体呼吸链由 4 种大分子复合酶组成,其中复合酶Ⅰ、Ⅲ、Ⅳ组成主要的呼吸链,催化 NADH(或 NADPH)的氧化;而复合酶Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ组成另一条呼吸链,催化琥珀酸的氧化^[16]。吴方丽^[10]研究发现,丙烷脒对活体条件下线粒体呼吸链复合酶Ⅲ的活性有明显抑制作用,而在离体条件下对其活性没有影响,并推断出丙烷脒可能是通过与编码线粒体复合酶Ⅲ某个亚基的基因结合而起作用。本试验中,敏感菌株线粒体复合酶Ⅲ活性的变化与吴方丽的研究结果一致,但抗性菌株线粒体复合酶Ⅲ的活性在离体和活体条件下均未被抑制,推测此变化与抗药性的产生有关。至于抗药性产生的原因是由于靶基因的突变使药剂亲和力下降,或是其他原因,还有待于进一步研究。

[参考文献]

[1] Prins T W, Tudzynski P, Tiedemann A V. Infection strategies of *Botrytis cinerea* and related necrotrophic pathogens [C]// Kronstad J W. Fungal pathology. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000: 33-64.

[2] Zhang C Q, Yuan S K, Sun H Y, et al. Sensitivity of *Botrytis cinerea* from vegetable greenhouses to boscalid [J]. Plant Pathology, 2007, 56: 646-653.

[3] Baroffio C A, Siegfried W, Hilber U W. Long-term monitoring for resistance of *Botrytis cinerea* to anilinopyrimidine, phenylpyrrole, and hydroxylanilide fungicide in Switzerland [J]. Plant Disease, 2003, 87: 662-666.

[4] Beever R E, Laracy E P, Park H A. Strain of *Botrytis cinerea* resistant to dicarboximide and benzimidazole fungicides in New Zealand vineyards [J]. Plant Pathology, 1989, 38: 427-437.

[5] 纪明山,程根武,张益先,等. 灰霉病菌对多菌灵和乙霉威抗性研究 [J]. 沈阳农业大学学报, 1998, 29(3): 213-216.

Ji M S, Cheng G W, Zhang Y X, et al. Studies on resistance to carbendazim and diethofencarb of *Botrytis cinerea* [J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 1998, 29(3): 213-216. (in Chinese)

[6] 纪明山,祁之秋,王英姿,等. 番茄灰霉病菌对噁霉胺的抗药性 [J]. 植物保护学报, 2003, 30(4): 396-400.

Ji M S, Qi Z Q, Wang Y Z, et al. Resistance of *Botrytis cinerea* to pyrimethanil in tomato [J]. Acta Phytophylacica Sinica, 2003, 30(4): 396-400. (in Chinese)

[7] Jiang J H, Ding L S, Michailides T J, et al. Molecular characterization of field azoxystrobin-resistant isolates of *Botrytis cinerea* [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2009, 93: 72-76.

[8] 吴方丽,陈安良,王智辉,等. 丙烷脒对番茄灰霉病菌超微结构的影响 [J]. 浙江大学学报:农业与生命科学版, 2007, 33(1): 74-81.

Wu F L, Chen A L, Wang Z H, et al. Effect of propamidine on

- cell ultrastructure of *Botrytis cinerea* [J]. Journal of Zhejiang University: Agric & Life Sci Edi, 2007, 33(1): 74-81. (in Chinese)
- [9] 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 & 相对渗率变化研究 [J]. 农药学报, 2005, 7(2): 126-130.
- Xia X M, Wang K Y, Fan K, et al. Changes of relative leakage and osmolarity sensitivity to tebuconazole-resistant strains of *Rhizoctonia cerealis* [J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2005, 7(2): 126-130. (in Chinese)
- [10] 吴方丽. 丙烷脒对番茄灰霉病菌的抑菌机理初探 [D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2008.
- Wu F L. Primary study on inhibiting mechanism of propamidine against *Botrytis cinerea* [D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University, 2008. (in Chinese)
- [11] 熊 杰,冯亦璞. 丁基苯酞对线粒体呼吸链复合酶活性的影响 [J]. 药学报, 1999, 34(4): 241-245.
- Xiong J, Feng Y P. Effects of butylphthalide on the activities of complexes of the mitochondrial respiratory chain [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 1999, 34(4): 241-245. (in Chinese)
- [12] 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 X Q, Cao J W, Zhai C, 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)
- [13] 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 & 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 Y J, Gao J M, Han J C, et al. Osmolarity sensitivity and relative conductivity of procymidon-resistant strains of *Botrytis cinerea* Pers. [J]. Journal of Shanxi Agricultural University: Nature Science Edition, 2004, 24(1): 34-36. (in Chinese)
- [14] Ellis S W, Grindle M. Effect of osmotic stress on yield and polyolcontent of dicarboximide sensitive and resistant strains of *Neurospora crassa* [J]. Mycol Res, 1981, 95: 457-464.
- [15] O'Neill P M, Bishop L P, Sesler N L, et al. The biomimetic iron-mediated degradation of arteflene (Ro-42-1611), an endoperoxide antimalarial-implications for the mechanism of antimalarial activity [J]. Tetrahedron Lett, 1997, 38(24): 4263-4266.
- [16] 翟中和,王喜忠,丁明孝. 细胞生物学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 213-214.
- Zhai Z H, Wang X Z, Ding M X. Cell biology [M]. Beijing: Higher Education Press, 2000: 213-214. (in Chinese)

(上接第 137 页)

- [8] 袁景军,张林森,赵政阳,等. 大改形对富士苹果密植树生长结果 & 效益的影响 [J]. 西北林学院学报, 2003, 18(4): 60-62.
- Yuan J J, Zhang L S, Zhao Z Y, et al. Effect of modifying tree form on growth and fruiting in fuji apple high-density orchards [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2003, 18(4): 60-62. (in Chinese)
- [9] 王雷存,赵政阳,董利杰,等. 红富士苹果密闭树改形修剪效应的研究 [J]. 西北林学院学报, 2004, 19(4): 65-67.
- Wang L C, Zhao Z Y, Dong L J, et al. Improvement of production of shade red Fuji by modifying crown [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2004, 19(4): 65-67. (in Chinese)
- [10] 张显川,高照全,付占方,等. 苹果树形改造对树冠结构和冠层光合能力的影响 [J]. 园艺学报, 2007, 34(3): 537-542.
- Zhang X C, Gao Z Q, Fu Z F, et al. Influences of tree form reconstruction on canopy structure and photosynthesis of apple [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2007, 34(3): 537-542. (in Chinese)
- [11] 李丙智,阮班录,君广仁,等. 改形对红富士苹果树体光合能力及果实品质的影响 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2005, 33(5): 119-122.
- Li B Z, Ruan B L, Jun G R, et al. Effects of modifying tree form on photosynthetic ability and fruit quality of red Fuji apple [J]. Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry: Natural Science Edition, 2005, 33(5): 119-122. (in Chinese)
- [12] 邹 琦. 植物生理生化实验指导 [M]. 上海: 海科技出版社, 1978.
- Zou Q. Physiology and biochemistry experimental direction [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1978. (in Chinese)
- [13] 苏渤海,范崇辉,李国栋,等. 红富士苹果改形过程中不同树形光照分布 & 其对产量品质的影响 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2008, 36(1): 158-162.
- Su B H, Fan C H, Li G D, et al. Effects of modifying between light distribution, yield and quality of different shapes on "Red Fuji" apple [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2008, 36(1): 158-162. (in Chinese)
- [14] 张微慧,张光伦. 光质对果树形态建成 & 果实品质的生理生态效应 [J]. 中国农学通报, 2007, 23(1): 78-83.
- Zhang W H, Zhang G L. The physiological and ecological effect of light quality to morphogenesis and fruit quality [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2007, 23(1): 78-83. (in Chinese)
- [15] 高登涛,韩明玉,李丙智,等. 渭北 3 种不同类型苹果园冠层特性 & 光照特性 [J]. 果树学报, 2007, 24(3): 259-262.
- Gao D T, Han M Y, Li B Z, et al. Canopy characteristics and light distribution in three types of apple orchards in Weiwei area, Shaanxi province [J]. Journal of Fruit Science, 2007, 24(3): 259-262. (in Chinese)