

山西省番茄早疫病菌对苯醚甲环唑的敏感性 及抗性突变体的适合度

史晓晶^{1*} 任璐² 王华杰¹ 韩佳音¹

(1. 忻州师范学院生物系, 忻州 034000; 2. 山西农业大学农学院, 太谷 030801)

摘要: 为了解山西省番茄早疫病菌 *Alternaria solani* 对苯醚甲环唑的抗性, 采用菌丝生长速率法检测了该病菌对苯醚甲环唑的敏感性, 分析了抗性水平和抗性指数; 同时通过室内诱导获得了苯醚甲环唑抗性突变体, 检测了突变体的抗性遗传稳定性、交互抗性和适合度。结果表明: 分离自大同、忻州、长治、晋中和运城 5 市的 101 株菌株的 EC_{50} 范围为 0.005~3.315 mg/L, 均值为 0.428 mg/L, 其中敏感菌株占 97.03%, 低抗菌株占 2.97%; 抗性指数范围为 0.295~0.447, 均值为 0.343。10 株中抗突变体抗性均不能稳定遗传、生长速率减慢、产孢量降低、孢子萌发能力减弱、致病力下降; 但在药剂压力下, 突变体的致病力强于敏感菌株。苯醚甲环唑与代森锰锌、多抗霉素、啶酰菌胺无交互抗性, 而与啶菌噁唑存在交互抗性。因此, 今后需加强番茄早疫病菌对苯醚甲环唑的田间抗性监测, 在生产过程中轮用或混用不同作用机制的药剂以延缓该病菌对苯醚甲环唑抗性的发展。

关键词: 番茄早疫病菌; 苯醚甲环唑; 敏感性; 适合度

Sensitivity of early blight pathogen *Alternaria solani* to difenoconazole and fitness of resistant mutants

Shi Xiaojing^{1*} Ren Lu² Wang Huajie¹ Han Jiayin¹

(1. Department of Biology, Xinzhou Teachers University, Xinzhou 034000, Shanxi Province, China; 2. College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi Province, China)

Abstract: To understand the resistant situation of early blight pathogen *Alternaria solani* to difenoconazole in Shanxi Province, the sensitivity to difenoconazole were tested, and the resistance level and the resistance index were analyzed. Also, the difenoconazole-resistant mutants, which were induced in the laboratory, were studied on the genetic stability of resistance, the cross-resistance and the fitness. The results showed that the EC_{50} values of 101 isolates from Datong, Xinzhou, Changzhi, Jinzhong, and Yuncheng cities ranged from 0.005 to 3.315 mg/L with the mean value of 0.428 mg/L. Among these isolates, 97.03% showed sensitive to difenoconazole, and 2.97% isolates had low resistance. The resistance index ranged from 0.295 to 0.447 with the mean value of 0.343. Ten mutants with medium resistance to difenoconazole were derived from induction in the laboratory, but the resistance couldn't be inherited steadily. And their mycelial growth, sporulation, spore germination, and pathogenicity were declined. The pathogenicity of mutants was better than that of sensitive isolates under the stress of difenoconazole. No cross-resistance was detected between difenoconazole and mancozeb, polyoxin, or boscalid, excluding pyrisoxazole. Therefore, the sensitivity of *A. solani* to difenoconazole should be monitored continuously in future, and the mixed or rotated application of fungicides with different mechanism should

基金项目: 忻州师范学院科研基金(201716), 山西省自然科学基金(201601D102024), 忻州师范学院博士科研启动项目

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: xzsysxj@sina.com

收稿日期: 2017-09-05

be considered to postpone the development of resistance.

Key words: *Alternaria solani*; difenoconazole; sensitivity; fitness

山西省自实施“设施蔬菜百万棚行动计划”以来,蔬菜种植面积逐年扩大,其中,番茄的种植面积、产量和产值均位于全省蔬菜种植前10名(秦潮等,2015)。由茄链格孢菌 *Alternaria solani* 侵染所致的番茄早疫病是番茄生产中的重要病害(郝变青等,2013;董艳等,2015),在植株的整个生长发育期普遍发生,发病严重时造成落叶、落果和断枝现象,严重影响产量(董金皋,2001)。虽然有多种措施用于防治番茄早疫病,但使用杀菌剂仍是最快速有效的方式(Chaerani & Voorrips, 2006)。

苯醚甲环唑是一种麦角甾醇生物合成抑制剂类杀菌剂,对番茄早疫病菌(王海强等,2008)、小麦纹枯病菌 *Rhizoctonia cerealis* (Hamada et al., 2011)、小麦全蚀病菌 *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Yun et al., 2012)、红树莓褐斑病菌 *Didymella applanata* (Mirković et al., 2015)、番茄叶霉病菌 *Cladosporium fulvum* (王晓坤等, 2017)、香榧果实褐斑病菌 *A. alternata* (张书亚等, 2017)等植物病原菌均具有良好的抑制作用。杀菌剂抗性行动委员会(Fungicide Resistance Action Committee, FRAC)认为病原菌对苯醚甲环唑存在中度抗性风险(FRAC, 2016),用药不当或长期频繁使用将会导致其抗药性的产生与发展。赵建江等(2010)检测到9.5%的灰葡萄孢菌 *Botrytis cinerea* 对苯醚甲环唑呈低水平抗性;Mondino et al. (2015)发现苹果黑星病菌 *Venturia inaequalis* 对苯醚甲环唑已产生一定程度的抗性;徐建强等(2016)检测到苯醚甲环唑对河南省小麦纹枯病菌的 EC_{50} 均值为0.165 mg/L,比Hamada et al. (2011) 2008—2009年间采集菌株的 EC_{50} 均值(0.06 mg/L)上升了2.75倍,且刘刚(2016)已明确指出该省小麦纹枯病菌对苯醚甲环唑的敏感性出现下降现象;韩永超等(2016)检测到湖北省草莓炭疽病菌 *Colletotrichum* spp. 中已出现了苯醚甲环唑低抗群体。

苯醚甲环唑在山西省已使用多年,但至今未见关于番茄早疫病菌对苯醚甲环唑敏感性检测的研究报道。因此,本试验以分离自山西省5个市的番茄早疫病菌为材料,测定其对苯醚甲环唑的敏感性,根据已报道的敏感基线分析其抗性水平与抗性指数,评价其对苯醚甲环唑的抗性情况;通过室内诱导苯醚甲环唑抗性突变体,探讨抗性突变体与敏感菌株之间的适合度变化,并分析苯醚甲环唑与其它常用

药剂之间是否存在交互抗性,从而评估番茄早疫病菌对苯醚甲环唑的抗性风险,以期苯醚甲环唑的合理使用及制定抗药性治理对策提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株及番茄:101株番茄早疫病菌菌株于2012—2014年在忻州师范学院生物系微生物实验室分离获得,其中大同市17株、忻州市20株、长治市14株、晋中市31株、运城市19株。番茄品种为白果强丰,购于河北省青县纯丰蔬菜良种繁育场,育苗至5~6片真叶完全展开后,将第5和第6片叶用于致病性测定。

供试药剂及试剂:95%苯醚甲环唑(difenoconazole)原药,安徽绩溪农华生物科技有限公司;96.2%啮酰菌胺(boscalid)原药,扬州昱峰化工有限公司;91.2%啮菌噁唑(pyrisoxazole)原药,沈阳化工研究所;35%多抗霉素(polyoxin)原药,辽宁科生生物化学制品有限公司;56%代森锰锌(mancozeb)可湿性粉剂,温州市鹿城植保化学厂;代森锰锌用无菌水配制成10 000 mg/L母液,其余4种药剂均用丙酮配制10 000 mg/L母液,4℃下保存备用;使用时用无菌水稀释。试验中所用化学试剂均为国产分析纯。

培养基及仪器:马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基:马铃薯200 g、葡萄糖20 g、琼脂20 g、蒸馏水1 L。SPX-150B-Z型生化培养箱,上海博迅实业有限公司医疗设备厂;血球计数板,上海市求精生化试剂仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 番茄早疫病菌对苯醚甲环唑的敏感性测定

用无菌水稀释苯醚甲环唑母液并混入PDA培养基中,分别制成终浓度为0.1、0.5、1、5、10 mg/L的含药培养基。将番茄早疫病菌菌株接种于PDA平板上,25℃培养4 d后在菌落边缘1/3处制备直径为5 mm的菌碟,挑取菌碟扣在含药培养基中心,每皿1块。以加入相同体积无菌水的PDA平板为对照。每药剂浓度、每株菌株均重复3次。25℃培养5 d后采用十字交叉法测量菌落净生长量,计算各浓度苯醚甲环唑对菌丝生长的抑制率。根据药剂浓度对数值与菌丝生长抑制率之间的关系,求出 EC_{50} 。菌丝生长抑制率=[1-(药剂处理菌落直径-菌碟直径)/

(对照菌落直径-菌碟直径)] $\times 100\%$ 。

番茄早疫病菌对苯醚甲环唑的敏感基线为0.305 mg/L(王海强等,2008),根据此基线计算菌株的抗性倍数(resistance factor, RF)。RF=菌株EC₅₀/敏感基线,其中RF ≤ 5 为敏感类型,5<RF ≤ 20 为低抗类型,20<RF ≤ 100 为中抗类型,>100为高抗类型(任璐等,2014)。根据此分级标准统计并分析菌株的抗性水平和抗性频率。抗性频率=抗性菌株数/全部菌株数 $\times 100\%$ 。

1.2.2 各市菌株对苯醚甲环唑的抗性指数分析

根据Zhao et al.(2013)方法将整个群体的EC₅₀值分成6组。第1组:0<EC₅₀ ≤ 0.6 mg/L;第2组:0.6 mg/L<EC₅₀ ≤ 1.2 mg/L;第3组:1.2 mg/L<EC₅₀ ≤ 1.8 mg/L;第4组:1.8 mg/L<EC₅₀ ≤ 2.4 mg/L;第5组:2.4 mg/L<EC₅₀ ≤ 3.0 mg/L;第6组:3.0 mg/L<EC₅₀ ≤ 3.6 mg/L。根据公式计算各市菌株对苯醚甲环唑的抗性指数(resistance index, RI)。RI= $\Sigma(C_i \times F_i)/i \times$ 总菌株数,其中,C_i表示组值(i=1~6),F_i表示某市第i组中菌株数占该市总菌株数的百分比。

1.2.3 抗性突变体诱导及其抗性水平测定

根据1.2.1的结果,选取敏感菌株J13(EC₅₀=0.513 mg/L)、D11(EC₅₀=0.543 mg/L)和Y3(EC₅₀=0.518 mg/L)为诱导初始菌株。将J13、D11和Y3菌株接种在PDA平板上,25℃培养至菌丝长满皿,然后加入无菌水洗下分生孢子,经4层无菌纱布过滤后用血球计数法测定分生孢子悬浮液的浓度,并将浓度调节至约8 $\times 10^5$ 个/mL。取0.1 mL分生孢子悬浮液涂布在含10 mg/L苯醚甲环唑的PDA平板上,25℃培养24 h后,紫外灯下20 cm处照射6 min,再于25℃下黑暗培养10 d。将存活菌落转接到苯醚甲环唑浓度为15 mg/L的含药PDA培养基上以同样方法处理并培养,之后用相同方法逐渐提高药剂浓度,直到获得抗性突变体。测定抗性突变体EC₅₀、计算抗性倍数并分析抗性水平。

1.2.4 抗性突变体的遗传稳定性测定

将1.2.3中获得的抗性突变体在无药PDA平板上连续继代培养20代,周期为4 d,测定第1、10、20代抗性突变体的EC₅₀,计算敏感性变化倍数(factor of sensitivity change, FSC)。每处理3次重复。FSC=RF_n/RF₁,其中n为继代数。

1.2.5 抗性突变体对常用药剂的交互抗性测定

参照1.2.1中的方法制备含药培养基,其中,啮菌唑的终浓度为0.5、1、5、10、20 mg/L;啮酰菌胺和多抗霉素的终浓度为1、5、10、50、100 mg/L,代森

锰锌的终浓度为0.875、4.375、8.75、43.75、87.5 mg/L。测定代森锰锌、多抗霉素、啮酰菌胺和啮菌唑对苯醚甲环唑抗性突变体的EC₅₀,分析各药剂对菌株EC₅₀的相关性,以确定苯醚甲环唑与这4种药剂的交互抗性。

1.2.6 抗性突变体适合度的测定

生长速率:将敏感菌株J13、D11、Y3与抗性突变体的5 mm菌碟接种在PDA平板上,25℃培养4 d后采用十字交叉法测量菌落直径,计算生长速率。生长速率=(菌落直径-菌碟直径)/(培养时间 $\times 2$)。每处理3次重复。

产孢量:待上述3种敏感菌株和抗性突变菌株菌丝长满皿后,将皿内培养物与培养基一起置于250 mL三角瓶中,加入50 mL无菌水,充分振荡以洗下分生孢子,经4层纱布过滤即得分生孢子悬浮液,采用血球计数法测定分生孢子悬浮液的浓度,确定菌株的产孢量。每处理3次重复。

萌发率:将产孢量测定中制备的分生孢子悬浮液稀释至10⁵个/mL,取100 μ L滴在凹玻片中央,25℃保湿培养8 h,镜检孢子萌发情况,镜检的孢子数量不少于300个,计算孢子萌发率。每处理3次重复。孢子萌发率=孢子萌发数/镜检总数 $\times 100\%$ 。

致病性:用75%酒精浸泡番茄健康叶片1 min,无菌水冲洗3次,晾干,然后制成直径2 cm的叶盘。将叶盘浸入10 mg/L苯醚甲环唑溶液中10 s,晾干,以浸入无菌水10 s为对照。将产孢量测定中制备的分生孢子悬浮液稀释至10⁴个/mL,取10 μ L均匀涂布在叶盘上,然后将叶盘放入有湿润滤纸的无菌培养皿中,25℃培养3 d后测量叶片的发病面积。每处理3次重复。

1.3 数据分析

数据均采用DPS 7.05、SPSS 17.0和Excel 2003软件处理,各市菌株的抗性指数采用 χ^2 独立性测验法进行检验,交互抗性采用皮尔逊相关性分析,适合度采用Duncan氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 番茄早疫病菌对苯醚甲环唑的敏感性

苯醚甲环唑对101株番茄早疫病菌菌株的EC₅₀范围为0.005~3.315 mg/L,均值为0.428 mg/L,菌株对苯醚甲环唑的抗性频率为2.97%(表1)。其中,大同市菌株EC₅₀变化达16倍,幅度较大,且出现3株低抗菌株,抗性频率为17.65%;而在其它市并未检测到抗性菌株(表1)。说明山西省番茄早疫病菌对苯

醚甲环唑基本上未产生抗性,绝大多数群体对苯醚甲环唑仍敏感。

2.2 各市菌株对苯醚甲环唑的抗性指数分析

山西省各市番茄早疫病菌株对苯醚甲环唑的抗性指数范围为 0.295~0.447,均值为 0.343(表 1)。

最高抗性指数与最低抗性指数分别出现在大同市和运城市,且只有大同市的抗性指数高于均值,经 χ^2 独立性测验法检验,发现这 5 个市的番茄早疫病菌株对苯醚甲环唑的抗性均无显著差异($\chi^2=0.78<\chi^2_{0.05, 20}, P>0.05$)。

表 1 各市番茄早疫病菌株对苯醚甲环唑的敏感性
Table 1 Sensitivity of *Alternaria solani* to difenoconazole from different cities

市 City	菌株数 No. of strains	EC ₅₀ (mg/L)	S		RL		RM		RH		RI
			数量 No.	频率 (%) Frequency	数量 No.	频率 (%) Frequency	数量 No.	频率 (%) Frequency	数量 No.	频率 (%) Frequency	
大同 Datong	17	0.207~3.315	14	82.35	3	17.65	0	0.00	0	0.00	0.447
晋中 Jinzhong	31	0.052~0.513	31	100.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0.319
忻州 Xinzhou	20	0.052~0.981	20	100.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0.322
运城 Yuncheng	19	0.005~1.134	19	100.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0.295
长治 Changzhi	14	0.193~1.123	14	100.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0.330
总计 Total	101	0.005~3.315	98	97.03	3	2.97	0	0.00	0	0.00	—

S: 敏感; RL: 低抗; RM: 中抗; RH: 高抗; RI: 抗性指数。RI 值采用 χ^2 独立性测验法进行检验,自由度为 20, $\chi^2_{0.05, 20} = 31.41$ 。S: Sensitive; RL: low resistance; RM: moderate resistance; RH: high resistance; RI: resistance index. The RI values are analyzed with the chi-square test (χ^2 test) for independence estimate. The degree of freedom is 20, $\chi^2_{0.05, 20} = 31.41$.

2.3 抗性突变体的诱导及抗性水平

通过诱导共获得 10 株抗性突变体,EC₅₀ 为

11.229~27.535 mg/L,抗性倍数为 36.81~90.28,均对苯醚甲环唑处于中抗水平(表 2)。

表 2 番茄早疫病菌株第 1 代抗性突变体对苯醚甲环唑的抗性
Table 2 Sensitivity of the 1st generation mutants resistant to difenoconazole

菌株 Isolate	毒力回归方程 Regression equation	R ²	EC ₅₀ (mg/L)	抗性倍数 Resistance factor	抗性水平 Resistance level
R13-2	y=4.235+0.703x	0.925	12.256	40.18	RM
R13-3	y=4.398+0.546x	0.929	12.708	41.67	RM
R13-4	y=4.456+0.518x	0.966	11.229	36.81	RM
R11-1	y=4.333+0.465x	0.968	27.286	89.46	RM
R11-4	y=4.069+0.716x	0.932	19.931	65.35	RM
R11-6	y=3.938+0.905x	0.997	14.926	48.94	RM
R3-2	y=4.169+0.631x	0.951	20.741	68.00	RM
R3-3	y=4.029+0.783x	0.973	17.375	56.97	RM
R3-4	y=3.904+0.844x	0.978	19.945	65.39	RM
R3-6	y=3.985+0.705x	0.935	27.535	90.28	RM

RM: 中抗。RM: Moderate resistance.

2.4 抗性突变体的遗传稳定性

抗性突变体第 1 代的抗性倍数为 36.81~90.28(表 2),第 10 代和第 20 代的抗性倍数分别为 31.41~83.05 和 29.54~79.21,抗性略有变化;第 10 代和第 20 代的敏感性变化倍数均低于 0.95,且随着培养代数增加,敏感性变化倍数呈下降趋势,表明抗性突变体对苯醚甲环唑的抗性不能稳定遗传(表 3)。

2.5 抗性突变体对常用药剂的交互抗性分析

将杀菌剂对抗性突变体的 EC₅₀ 转化为对数值,

分析苯醚甲环唑与其它药剂的相关性:抗性突变体对苯醚甲环唑的敏感性与对啶酰菌胺、多抗霉素和代森锰锌的敏感性间的相关系数均较低,分别为 0.12、-0.28、0.11,均无显著相关性,表明苯醚甲环唑抗性突变体对啶酰菌胺、多抗霉素和代森锰锌敏感,无交互抗性;与对啶菌噁唑的敏感性间的相关系数为 0.85($P<0.05$),表明苯醚甲环唑抗性突变体对啶菌噁唑的敏感性显著下降,病菌在这 2 种药剂间存在交互抗性。

2.6 抗性突变体的适合度

敏感菌株 J13、W11 和 Y3 的生长速率(11.69~11.94 mm/d)、产孢量($4.15 \times 10^6 \sim 4.50 \times 10^6$ 个/mL)和孢子萌发率(54.77%~55.84%)均显著高于抗性突变体的生长速率(5.00~9.13 mm/d)、产孢量($2.20 \times 10^6 \sim 3.50 \times 10^6$ 个/mL)和孢子萌发率(38.51%~43.68%)(表4)。敏感菌株 J13 侵染番茄叶片的发病面积为 3.07 cm^2 , 而抗性突变体的发病面积为 $1.64 \sim 2.57 \text{ cm}^2$,

致病力显著下降;当环境中存在 10 mg/L 苯醚甲环唑时,抗性突变体的发病面积为 $1.67 \sim 2.09 \text{ cm}^2$,致病力显著强于敏感菌株 J13(0.65 cm^2)(图1)。表明番茄早疫病菌对苯醚甲环唑产生抗性后,生长与繁殖能力显著下降,致病力也随之减弱,与敏感菌株的生存竞争处于劣势,难以发展成为优势菌株,但在苯醚甲环唑胁迫下,抗性群体的致病力则表现出一定的竞争优势。

表3 番茄早疫病菌抗性突变体的遗传稳定性

Table 3 Stability of mutants resistant to difenoconazole

菌株 Isolate	EC ₅₀ (mg/L)			抗性倍数 Resistance factor		第10代敏感性变化倍数 Factor of sensitivity change of the 10th generation (FSC _{10th})	第20代敏感性变化倍数 Factor of sensitivity change of the 20th generation (FSC _{20th})
	1st	10th	20th	10th	20th		
R13-2	12.26	10.62	9.51	34.82	31.18	0.87	0.78
R13-3	12.71	11.15	10.21	36.56	33.48	0.87	0.80
R13-4	11.23	9.58	9.01	31.41	29.54	0.85	0.80
R11-1	27.29	25.18	24.01	82.56	78.72	0.92	0.88
R11-4	19.93	17.56	15.77	57.57	51.70	0.88	0.79
R11-6	14.93	12.91	10.43	42.33	34.20	0.86	0.70
R3-2	20.74	19.01	17.92	62.33	58.75	0.92	0.86
R3-3	17.37	16.63	14.58	54.52	47.80	0.95	0.84
R3-4	19.94	18.23	16.85	59.77	55.25	0.91	0.84
R3-6	27.54	25.33	24.16	83.05	79.21	0.92	0.88

表4 敏感菌株与抗性突变体的生长速率、产孢量
和孢子萌发率比较

Table 4 The comparison of growth rate, sporulation, and spore germination rate of resistant mutants and sensitive isolates

菌株 Isolate	生长速率 Growth rate (mm/d)	产孢量 Sporulation ($\times 10^6$ 个/mL)	萌发率 Germination rate (%)
J13	11.75±0.46 a	4.15±0.49 a	55.84±6.85 a
D11	11.94±0.43 a	4.50±0.40 a	54.77±1.83 a
Y3	11.69±0.90 a	4.35±0.52 a	55.66±8.12 a
R13-2	9.13±0.14 b	3.50±0.40 b	38.51±7.02 b
R13-3	8.56±0.13 bc	3.40±0.52 b	42.89±5.91 b
R13-4	9.13±0.32 b	3.50±0.64 b	39.04±5.54 b
R11-1	5.06±0.43 e	2.35±0.29 c	38.67±1.26 b
R11-4	5.44±0.31 e	2.20±0.21 c	38.58±4.36 b
R11-6	6.38±0.14 d	2.75±0.35 c	39.27±8.28 b
R3-2	6.44±0.24 d	2.60±0.29 c	41.55±4.18 b
R3-3	6.25±0.35 d	2.70±0.37 c	43.68±7.45 b
R3-4	5.31±0.38 e	2.25±0.40 c	40.06±7.36 b
R3-6	5.00±0.20 e	2.20±0.21 c	38.94±5.48 b

表中数据为平均数±标准差。同列数据后不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P < 0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SD. Different letters in the same column indicate significant difference at $P < 0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

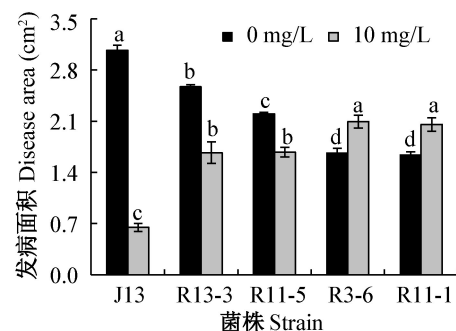


图1 敏感菌株与抗性突变体的致病力测定

Fig. 1 The pathogenicity of resistant mutants and sensitive isolate

图中数据为平均数±标准差。同色柱上不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P < 0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SD. Different letters on the same color bars indicate significant difference at $P < 0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

3 讨论

抗药性的出现会降低杀菌剂药效、增加生产成本,因此杀菌剂的抗药性已成为近十年来全球农作物保护方面的重要问题(Mondino et al., 2015)。在生产实践中,由于麦角甾醇生物合成抑制剂被大量、

连续地使用,已有一些植物病原菌对其产生了抗药性(刘英华等,2003;苏平等,2010)。目前,番茄病害的防治主要依靠杀菌剂,所以了解病原菌对杀菌剂的敏感性对于病害防治和抗药性治理非常重要。本研究发现山西省番茄早疫病病原野生菌群对苯醚甲环唑的敏感性存在差异,敏感性范围(0.005~3.315 mg/L)分布较宽,相差637.44倍。而已报道的湖北省草莓炭疽病菌对苯醚甲环唑的敏感性范围仅相差18.51倍(韩永超等,2016),低于本试验的结果,说明山西省番茄早疫病病原对苯醚甲环唑抗性的产生与发展存在潜在风险。

一般情况下,通常单独采用 EC_{50} 或抗性频率来评价某地区是否可以继续使用某药剂,但这种抗药性评价较为片面,因为抗性频率只能代表菌群的整体情况,未考虑到每株测试菌株的 EC_{50} (Shi et al., 2015)。而抗性指数却能同时考虑到抗性频率和 EC_{50} ,从而体现出某一地区菌群对杀菌剂的真实敏感性(Zhao et al., 2013)。本试验中,分离自山西省5个市的101株菌株有97.03%的病原群体对苯醚甲环唑敏感,只有2.97%的低抗菌株,虽然这些抗性菌株均来自于大同市,但与其它市的情况无显著差异。因此,抗性指数可以在任何情况下都能合理精确地评判杀菌剂的抗性水平,对于在某区域范围内应用杀菌剂协助作物病害控制策略的制订将有极大的帮助(Shi et al., 2015)。

将低抗菌株用作抗药性风险评估稍有欠缺。因此,通过室内诱导筛选出了10株抗性突变体,其最高抗性倍数为90.28,远高于任璐等(2017)诱导的苹果斑点落叶病菌 *Alternaria alternata* f. sp. *mali* 抗戊唑醇突变体的抗性倍数(31.68倍),但其对苯醚甲环唑仍处于中抗水平。加之诱导耗时较长、转接代数较多,故可认为采用室内诱导的方式不易形成抗性水平较高的突变体。本试验筛选出的抗性突变体其抗性不能稳定遗传,且生长速率减慢、产孢量降低、孢子萌发能力减弱、致病力下降,说明抗性突变体的适合度较差,难以发展成优势群体;但在苯醚甲环唑压力下,抗性突变体的致病力强于敏感菌株,表现出一定的竞争优势。这与叶滔等(2012)的报道相符。

今后,在番茄早疫病病害的防治上需加强对苯醚甲环唑的田间抗性监测。由于室内风险评估表现出抗性不能稳定遗传、适合度较差、与相同作用机制的唑菌噻唑存在交互抗性,因此在生产过程中要注意轮用或混用不同作用机制的药剂,以防止菌群对苯醚甲环唑的敏感性进一步下降,延缓抗性的发展、延

长药剂的使用期限,更好地达到有效防治病害的目的。植物病原菌对麦角甾醇生物合成抑制剂产生抗性的原因有 *cyp51* 基因位点突变(Chen et al., 2012; Carter et al., 2014)、*cyp51* 基因表达上调(Luo et al., 2008; Ma & Tredway, 2013)及转运蛋白表达量上调致使菌体主动外排杀菌剂(Kretschmer et al., 2009)等,而番茄早疫病病原对苯醚甲环唑的抗性属于哪种机制还有待进一步深入探讨论证。

参 考 文 献 (References)

- Carter HE, Fraaije BA, West JS, Kelly SL, Mehl A, Shaw MW, Cools HJ. 2014. Alterations in the predicted regulatory and coding regions of the sterol 14 α -demethylase gene (*CYP51*) confer decreased azole sensitivity in the oilseed rape pathogen *Pyrenopeziza brassicae*. *Molecular Plant Pathology*, 15(5): 513–522
- Chaerani R, Voorrips RE. 2006. Tomato early blight (*Alternaria solani*): the pathogen, genetics, and breeding for resistance. *Journal of General Plant Pathology*, 72(6): 335–347
- Chen FP, Fan JR, Zhou T, Liu XL. 2012. Baseline sensitivity of *Monilinia fructicola* from China to the DMI fungicide SYP-Z048 and analysis of DMI-resistant mutants. *Plant Disease*, 96(3): 416–422
- Dong JG. 2001. *Agricultural plant pathology* (north edition). Beijing: China Agriculture Press, pp. 385 (in Chinese) [董金皋. 2001. 农业植物病理学(北方本). 北京: 中国农业出版社, pp. 385]
- Dong Y, Chen YF, Zhang HP. 2015. Progresses of the microbial control of tomato early blight. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 31(17): 111–115 (in Chinese) [董艳, 陈永福, 张和平. 2015. 番茄早疫病微生物防治研究进展. 中国农学通报, 31(17): 111–115]
- FRAC. 2016. FRAC code list 2016: fungicides sorted by mode of action (including FRAC code numbering). <http://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2016.pdf?sfvrsn=2>
- Hamada MS, Yin YN, Ma ZH. 2011. Sensitivity to iprodione, difenoconazole and fludioxonil of *Rhizoctonia cerealis* isolates collected from wheat in China. *Crop Protection*, 30(8): 1028–1033
- Han YC, Xiang FY, Zeng XG, Chen FY, Gu YC. 2016. Sensitivity of *Colletotrichum* spp. from strawberry to difenoconazole in Hubei Province. *Journal of Plant Protection*, 43(3): 525–526 (in Chinese) [韩永超, 向发云, 曾祥国, 陈丰滢, 顾玉成. 2016. 湖北省草莓炭疽病菌对苯醚甲环唑的敏感性测定. 植物保护学报, 43(3): 525–526]
- Hao BQ, Ma LP, Zhu JS, Wang J, Qin S, Wang X, Qiao XW. 2013. Investigation on vegetables production quality safety in Shanxi and Hebei provinces. *Journal of Shanxi Agricultural Science*, 41(10): 1116–1118, 1121 (in Chinese) [郝变青, 马利平, 朱九生, 王静, 秦曙, 王霞, 乔雄梧. 2013. 山西、河北蔬菜生产质量安全调查. 山西农业科学, 41(10): 1116–1118, 1121]
- Kretschmer M, Leroch M, Mosbach A, Walker AS, Fillinger S, Mernke D, Schoonbeek HJ, Pradier JM, Leroux P, de Waard MA, et al.

2009. Fungicide-driven evolution and molecular basis of multi-drug resistance in field populations of the grey mould fungus *Botrytis cinerea*. PLoS Pathogens, 5(12): e1000696
- Liu G. 2016. Sensitivity to tebuconazole of *Rhizoctonia cerealis* in Henan Province in China was declined. Pesticide Market News, (28): 55 (in Chinese) [刘刚. 2016. 河南省小麦纹枯病菌出现对苯醚甲环唑敏感性下降群体. 农药市场信息, (28): 55]
- Liu YH, Wang KY, Jiang XY, Yi MQ, Wang HX. 2003. Resistance of *Rhizoctonia cerealis* to tebuconazole and the biological characters of tebuconazole-resistant strains. Journal of Plant Protection, 30(4): 423–428 (in Chinese) [刘英华, 王开运, 姜兴印, 仪美芹, 王怀训. 2003. 禾谷丝核菌对戊唑醇的抗性及其抗性菌系生物学特性. 植物保护学报, 30(4): 423–428]
- Luo CX, Cox KD, Amiri A, Schnabel G. 2008. Occurrence and detection of the DMI resistance-associated genetic element 'Mona' in *Monilinia fructicola*. Plant Disease, 92(7): 1099–1103
- Ma B, Tredway LP. 2013. Induced overexpression of cytochrome P450 sterol 14 α -demethylase gene (*CYP51*) correlates with sensitivity to demethylation inhibitors (DMIs) in *Sclerotinia homoeocarpa*. Pest Management Science, 69(12): 1369–1378
- Mirković B, Tanović B, Stević M, Hrustić J, Mihajlović M, Delibašić G, Vukša P. 2015. Toxicity of mancozeb, chlorothalonil, captan, fluopyram, boscalid, and difenoconazole to *Didymella applanata* isolates from Serbia. Journal of Environmental Science and Health Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes, 50(12): 845–850
- Mondino P, Casanova L, Celio A, Oscar B, Leoni C, Alaniz S. 2015. Sensitivity of *Venturia inaequalis* to trifloxystrobin and difenoconazole in Uruguay. Journal of Phytopathology, 163(1): 1–10
- Qin C, Li QH, Liu RY. 2015. Development situation and countermeasures of vegetable industry in Shanxi. China Agricultural Technology Extension, 31(3): 3–5 (in Chinese) [秦潮, 李庆华, 刘瑞宇. 2015. 山西蔬菜产业发展情况与对策建议. 中国农技推广, 31(3): 3–5]
- Ren L, Shi XJ, Yao Z, Han JC, Zhao XJ. 2017. Baseline sensitivity of *Alternaria alternata* f. sp. *mali* to tebuconazole and fitness of resistant mutants. Acta Phytopathologica Sinica, 47(3): 380–388 (in Chinese) [任璐, 史晓晶, 姚众, 韩巨才, 赵晓军. 2017. 苹果斑点落叶病菌对戊唑醇敏感基线建立及抗性突变体适合度. 植物病理学报, 47(3): 380–388]
- Ren L, Yu L, Han JC, Liu HP. 2014. Induction and characteristics of *Botrytis cinerea* resistant mutants to boscalid. Journal of Plant Protection, 41(1): 87–92 (in Chinese) [任璐, 余玲, 韩巨才, 刘慧平. 2014. 抗啉酰胺蔬菜灰霉病菌突变体的诱导及其生物学性状. 植物保护学报, 41(1): 87–92]
- Shi XJ, Ren L, Song YQ, Han JC, Liu HP, Zhang YJ. 2015. Sensitivity of *Alternaria solani* to boscalid and control of boscalid resistance with commonly-used fungicides in Shanxi, China. Australasian Plant Pathology, 44(3): 327–334
- Su P, Zhou ZQ, Hou H, Wang L, Zhu JL. 2010. Examination of sensitivity of *Botryosphaeria berengeriana* f. sp. *piricola* to tebuconazole. Journal of Fruit Science, 27(1): 69–76 (in Chinese) [苏平, 周增强, 侯琤, 王丽, 朱建兰. 2010. 苹果轮纹病菌对戊唑醇的敏感性检测. 果树学报, 27(1): 69–76]
- Wang HQ, Tian JS, Yan QP, Yuan SK. 2008. Comparison of the sensitivity of *Alternaria solani* which causing tomato late blight to seven fungicides and its baseline-sensitivity to difenoconazole. Agrochemicals, 47(4): 294–296 (in Chinese) [王海强, 田家顺, 严清平, 袁善奎. 2008. 番茄早疫病菌对7种杀菌剂的敏感性比较及其对苯醚甲环唑的敏感性基线建立. 农药, 47(4): 294–296]
- Wang XK, Guo BB, Gao YY, Mu W, Liu F. 2017. The toxicity of six triazole fungicides to *Cladosporium fulvum* and their safety and field efficacy in the control of tomato leaf mold. Journal of Plant Protection, 44(4): 671–678 (in Chinese) [王晓坤, 郭贝贝, 高杨杨, 慕卫, 刘峰. 2017. 六种三唑类杀菌剂对番茄叶霉病菌的毒力及其安全性和田间防效评价. 植物保护学报, 44(4): 671–678]
- Xu JQ, Diao XW, Li H, Yang X, Wang BB, Liu QT. 2016. Sensitivity to difenoconazole and tebuconazole of *Rhizoctonia cerealis* in Henan Province in China. Chinese Journal of Pesticide Science, 18(5): 582–588 (in Chinese) [徐建强, 刁兴旺, 李恒, 杨霞, 王蓓蓓, 刘庆涛. 2016. 中国河南省小麦纹枯病菌对苯醚甲环唑及戊唑醇的敏感性. 农药学报, 18(5): 582–588]
- Ye T, Ma ZQ, Bi QY, Niu FS, Han XY, Zhang XF, Wang WQ, Zhang LH. 2012. Research advances on the resistance of plant pathogenic fungi to SBIs fungicides. Chinese Journal of Pesticide Science, 14(1): 1–16 (in Chinese) [叶滔, 马志强, 毕秋艳, 牛芳胜, 韩秀英, 张小风, 王文桥, 张利辉. 2012. 植物病原真菌对甾醇生物合成抑制剂类(SBIs)杀菌剂的抗性研究进展. 农药学报, 14(1): 1–16]
- Yun YZ, Yu FW, Wang N, Chen HG, Yin YN, Ma ZH. 2012. Sensitivity to silthiofam, tebuconazole and difenoconazole of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* isolates from China. Pest Management Science, 68(8): 1156–1163
- Zhang SY, Li L, Chen XL, Qi QQ, Lou HZ, Zhang CQ. 2017. Identification of brown spot on fruit of *Torreya grandis* and screening of fungicides. Journal of Plant Protection, 44(5): 817–825 (in Chinese) [张书亚, 李玲, 陈秀龙, 戚钱钱, 楼焕泽, 张传清. 2017. 香榧果实褐斑病病原菌鉴定及防治药剂筛选. 植物保护学报, 44(5): 817–825]
- Zhao JJ, Han XY, Zhang XF, Ma ZQ, Wang WQ. 2010. The sensitivity of *Botrytis cinerea* to difenoconazole and cross-resistance against diverse fungicides. Chinese Agricultural Science Bulletin, 26(22): 282–286 (in Chinese) [赵建江, 韩秀英, 张小风, 马志强, 王文桥. 2010. 灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)对苯醚甲环唑的敏感性及其对不同杀菌剂的交互抗性. 中国农学通报, 26(22): 282–286]
- Zhao XJ, Ren L, Yin H, Zhou JB, Han JC, Luo Y. 2013. Sensitivity of *Pseudoperonospora cubensis* to dimethomorph, metalaxyl and fosetyl-aluminium in Shanxi of China. Crop Protection, 43(1): 38–44

(责任编辑:李美娟)