

吉林省西瓜蔓枯病菌对吡唑醚菌酯的抗性监测及抗性风险评估

孙东晗¹ 陈悦^{1,2} 田文学³ 白庆荣¹ 杨丽娜^{1*} 赵廷昌^{4*}

(1. 吉林农业大学植物保护学院, 长春 130118; 2. 黑河市农业农村服务中心, 黑龙江 黑河 164300; 3. 山东中农联合生物科技股份有限公司, 济南 250100; 4. 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193)

摘要: 为明确吉林省西瓜蔓枯病菌 *Stagonosporopsis citrulli* 对吡唑醚菌酯的敏感基线和抗性风险, 采用菌丝生长速率法测定吉林省 151 株西瓜蔓枯病菌菌株对吡唑醚菌酯的敏感性 & 吡唑醚菌酯对西瓜蔓枯病菌的最低抑制浓度, 并监测 375 株西瓜蔓枯病菌菌株对吡唑醚菌酯的抗性水平。结果表明, 供试的 151 株菌株对吡唑醚菌酯的敏感性频率分布呈连续的单峰曲线, 接近正态分布, 敏感基线为 1.800 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 吡唑醚菌酯的最低抑制浓度 MIC 为 80.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。抗性水平监测结果显示, 375 株菌株对吡唑醚菌酯的抗性频率为 0。室内药剂驯化获得的抗性突变菌株 T-LH3-1 和 T-XZC5-1 在连续转接培养 8 代后的 EC_{50} 分别为 16.139 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 31.782 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 抗性倍数分别为 15 和 51, 均为中抗水平, 抗药性可以稳定遗传。抗性突变体及其亲本菌株生物学性状结果显示, 抗性突变体生物适合度与其亲本菌株差异不显著。交互抗性结果表明, 吡唑醚菌酯与醚菌酯之间存在正交互抗性, 与戊唑醇、异菌脲、多菌灵和肟菌酯之间不存在交互抗性, 可以交替使用以达到延缓抗药性的产生。

关键词: 西瓜蔓枯病菌; 吡唑醚菌酯; 抗性监测; 抗性风险

Monitoring and risk evaluation of the resistance to pyraclostrobin in gummy stem blight pathogen *Stagonosporopsis citrulli* from watermelon in Jilin Province

Sun Donghan¹ Chen Yue^{1,2} Tian Wenxue³ Bai Qingrong¹ Yang Lina^{1*} Zhao Tingchang^{4*}

(1. College of Plant protection, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin Province, China; 2. Agricultural and Rural Service Center in Heihe, Heihe 164300, Heilongjiang Province, China; 3. Shandong Sino-Agri United Biotechnology Co., Ltd., Jinan 250100, Shandong Province, China; 4. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: To evaluate the resistance to pyraclostrobin in *Stagonosporopsis citrulli* causing gummy stem blight of *Citrullus lanatus* in Jilin Province, the sensitivity baseline and the minimum inhibitory concentration (MIC) to pyraclostrobin were determined for 151 *S. citrulli* strains collected from watermelon in Jilin Province based on mycelial growth rate. Meanwhile, the resistance levels to pyraclostrobin were also monitored for other 375 watermelon strains from Jilin. The results showed that the sensitivity frequency distribution of tested strains ($n=151$) was a continuous single peak curve close to a normal distribution. The sensitivity baseline was 1.800 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and the MIC was 80.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to pyraclostrobin for these strains. The resistance frequency of the 375 tested strains to pyraclostrobin was 0. Two intermediate pyraclostrobin-resistant mutants (T-LH3-1 and T-XZC5-1) were obtained by chemical taming. After

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD0201300), 财政部和农业部国家西甜瓜产业技术体系(CARS-25), 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(S2019XM06), 中国农业科学院创新工程(CAAS-ASTIP-2016-IPP)

* 通信作者 (Authors for correspondence), E-mail: yanglina20140@126.com, zhaotg@163.com

收稿日期: 2021-01-03

continuously culturing without the fungicide for eight generations, EC_{50} of T-LH3-1 and T-XZC5-1, were 16.139 $\mu\text{g/mL}$ and 31.782 $\mu\text{g/mL}$, respectively, and their resistance were 15 and 51 times of the resistance of their parents, respectively, remaining to be comparable to their parents, indicating that they still kept the intermediate resistance, and their resistance could be inherited stably. Comparison of the biological characteristics of both intermediate resistant mutants with their parental strains indicated that the biocompatibility of the resistant mutants were not significantly different from their parent strains. Cross-resistance results showed that there was a positive cross-resistance between pyraclostrobin and kresoxim-methyl, but there was no cross-resistance between pyraclostrobin and tebuconazole, iprodione, carbendazim, and trifloxystrobin, indicating that they could be used alternately so as to delay the development of resistance.

Key words: *Stagonosporopsis citrulli*; pyraclostrobin; resistant detection; risk of resistance

西瓜作为重要的经济作物,吉林省常年种植4万~5万 hm^2 ,是农村脱贫致富的重要产业。近年来,西瓜蔓枯病在吉林省西瓜主产区的危害逐年加剧,对西瓜的产量和品质造成了极大影响(赵彦杰等, 2008)。该病害主要由西瓜蔓枯病菌 *Stagonosporopsis citrulli* 引起,在西瓜整个生育期均可发病(Stewart et al., 2015)。经实地调查发现,吉林省内常用吡唑醚菌酯、苯醚甲环唑、咪鲜胺等药剂对其进行化学防治,且用药量较高。吡唑醚菌酯作为全球第2大销量的新兴杀菌剂(陈娟芳等, 2016),对该病害具有见效快、防治效率高等优势,在西瓜生产中备受青睐,使用频次及剂量均居前列。2019年本课题组对吉林省西瓜蔓枯病菌进行室内药剂敏感性的测定时发现该病菌对吡唑醚菌酯有较高的敏感性。

病原菌对杀菌剂产生抗药性是植物病害防治中所面临的一个重要问题,在降低防治效果的同时,也增加了防治成本(刁伊珺, 2017)。自吡唑醚菌酯投入使用以来,由于其作用位点单一,因此研究植物病害对其的抗性十分重要,近年来,研究表明,开心果晚疫病菌 *Alternaria alternata* (Avenot et al., 2008; Avenot & Michailides, 2015)、草莓灰霉病菌 *Botrytis cinerea* (肖婷等, 2017; 2018)和梨树上的链格孢菌 *Alternaria alternata* (Fan et al., 2015)等已对其产生抗药性。因此,对于病原菌的抗性监测问题近些年来也日益被重视,如任璐等(2015)研究结果显示,山西省不同地区的黄瓜白粉病菌 *Podosphaera xanthii* 对甲基硫菌灵的敏感性差异较大,其中运城市菌株的抗性较高;高新菊等(2017)研究发现,河南省部分地区麦田荠菜 *Capsella bursa-pastoris* 对苯磺隆产生了较高的抗性,最高抗性倍数为215.23。近年关于病原菌的室内抗性突变体的诱导

及其相关生物学性状的研究也逐渐增多,如任璐等(2015)研究报道,黄瓜白粉病菌对甲基硫菌灵的抗性在选择压力较弱的情况下是有可能丧失的。

吡唑醚菌酯在用于防治西瓜蔓枯病的同时,长期高剂量使用是否会引起病菌抗药性的产生已成为该病害防控的焦点问题。因此,本试验通过对吉林省西瓜蔓枯病菌对吡唑醚菌酯敏感基线的建立、抗性监测、抗性风险评估以及交互抗性等方面进行深入研究,为制订吡唑醚菌酯在防治西瓜蔓枯病过程中的合理用药策略、预防抗性产生等提供理论依据,以期为后续研究西瓜蔓枯病菌对吡唑醚菌酯的抗性机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株:2018—2019年连续2年在吉林省长春市农安县,松原市乾安县、长岭县,白城市通榆县、洮南市,四平市梨树县和双辽市共7个西瓜主产区采集具有西瓜蔓枯病病害的叶片,通过组织分离法共获得526株菌株,从中随机挑选西瓜蔓枯病优势种西瓜蔓枯病菌菌株151株用于敏感基线的建立以及最低抑制浓度的确定,另外375株菌株用于抗药性监测。黄瓜品种为津优211,西瓜品种为中兴红2号,均购于当地农贸市场。

供试药剂、试剂及仪器:98%吡唑醚菌酯(pyraclostrobin)原药,山东康乔生物科技有限公司;96%肟菌脂(trifloxystrobin)原药,湖北猫尔沃生物医药有限公司;96%异菌脲(iprodione)原药,江西禾益化工股份有限公司;98%多菌灵(carbendazim)原药,无锡市耀得信化工产品有限公司;97%戊唑醇(tebuconazole)原药,盐城凤阳化工有限公司;98%醚

菌酯(kresoxim-methyl)原药,湖北康宝泰精细化工有限公司。所有试剂均为国产分析纯。MJX型智能霉菌培养箱,宁波江南仪器厂制造。

供试培养基:马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基包括马铃薯200 g、琼脂14 g、葡萄糖20 g,用蒸馏水定容至1 L。

1.2 方法

1.2.1 含药培养基的配制

将供试药剂溶于丙酮配制成浓度为 1×10^4 $\mu\text{g/mL}$ 的母液,于4℃贮存备用(王建新等,2002)。将母液用无菌水10倍梯度依次稀释成1 000、100、10、1、0.1 $\mu\text{g/mL}$ 共5种浓度药液。然后将PDA培养基与制好的药液按体积比9:1混合均匀制成浓度为100、10、1、0.1和0.01 $\mu\text{g/mL}$ 的含药平板。

1.2.2 西瓜蔓枯病菌对吡唑醚菌酯敏感基线的建立

将供试菌株在PDA平板上培养4 d后,用灭菌枪头在菌落边缘打取直径为8 mm的菌饼移至浓度为100、10、1、0.1和0.01 $\mu\text{g/mL}$ 的PDA含药平板中央,每个浓度处理重复3次,以加等量无菌水的PDA培养基作为空白对照,在25℃恒温、全光照、相对湿度30%条件下培养,至对照菌落直径长至为培养皿2/3时,采用十字交叉法测量菌落直径。

利用SPSS 24.0软件计算药剂对病原菌的毒力回归方程 $y=a+bx$ 、相关系数 r 以及有效抑制中浓度 EC_{50} 。并绘制西瓜蔓枯病菌对吡唑醚菌酯的敏感性频率分布图,根据Gao et al.(2018)野生敏感型病原群体对药剂敏感性为正态分布的原理,确认病原菌群体 EC_{50} 敏感性频率分布是否呈正态分布或连续的单峰曲线,如果呈正态分布或连续的单峰曲线,就可将其群体 EC_{50} 均值作为病原菌对药剂的敏感基线。

1.2.3 吡唑醚菌酯对西瓜蔓枯病菌MIC值的确定

将1.2.2中测定过 EC_{50} 的151株敏感菌株按上述方法制成8 mm菌饼,移至吡唑醚菌酯浓度为50、60、70、80、90 $\mu\text{g/mL}$ 的PDA含药平板中央,于25℃恒温、全光照、相对湿度30%条件下培养,每个浓度处理均重复3次。培养4 d后,观察菌丝生长情况,将所有菌株均不能生长的最低浓度作为西瓜蔓枯病菌敏感菌株对吡唑醚菌酯的最低抑制浓度(minimal inhibition concentration, MIC)。

1.2.4 西瓜蔓枯病菌对吡唑醚菌酯的抗性监测

将2018—2019年采自吉林省7个县市的375株西瓜蔓枯病菌菌株活化培养后,按1.2.2中方法制成菌饼,分别移至含MIC浓度吡唑醚菌酯的PDA平板

上,以含等量无菌水的PDA培养基作空白对照,重复3次,在25℃恒温、全光照、相对湿度30%条件下培养4 d后,观察菌丝在含药培养基上生长情况划分抗性类型,若菌丝生长则记为抗性菌株,若菌丝不生长则记为敏感菌株,并计算抗性频率。抗性频率=抗性菌株数/总菌株数 $\times 100\%$ 。

1.2.5 西瓜蔓枯病菌抗吡唑醚菌酯突变体诱导

采用药剂驯化法诱导获得西瓜蔓枯病菌抗吡唑醚菌酯突变体。随机选取2018—2019年采自不同地区的田间敏感菌株接种于含 EC_{50} 浓度吡唑醚菌酯的PDA平板上,在25℃恒温、全光照、相对湿度30%条件下培养,待菌落生长至培养皿的2/3时,取菌落边缘菌饼,将其转移到下一浓度进行驯化培养,逐渐增加吡唑醚菌酯的含量,转接浓度比上一次浓度增加1倍,出现扇形突变或在含吡唑醚菌酯浓度大于MIC浓度的PDA上依然能够较好生长时的菌株即为疑似抗性突变体。将疑似抗性突变体接种到无药PDA平板上复壮培养,测定其 EC_{50} ,计算抗性倍数。抗性倍数=疑似抗性突变体的 EC_{50} /原始敏感菌株的 EC_{50} 。参照陈明丽等(2008)和刘顺涛(2016)方法对获得的疑似抗性突变菌株进行抗性水平划分。抗性倍数 ≤ 5 ,为敏感菌株;5<抗性倍数 ≤ 10 ,为低抗菌株;10<抗性倍数 ≤ 100 ,为中抗菌株;抗性倍数 > 100 ,为高抗菌株。

1.2.6 抗吡唑醚菌酯突变体遗传稳定性测定

将获得的抗性突变体在PDA平板上连续转接培养8代,每代均在25℃恒温、全光照、相对湿度30%条件下培养,测定各代的 EC_{50} ,各设3次重复,并将其与亲本菌株的 EC_{50} 进行比较,计算抗性倍数,计算方法同上,判断抗性突变体的遗传稳定性是否发生变化。

1.2.7 抗性突变体与其亲本菌株的生物学特性测定

抗性突变体与其亲本菌株致病性的测定:将已活化的抗性突变体菌株及其亲本敏感菌株在菌落边缘打取直径为8 mm的菌饼,菌丝面朝下接种到用75%乙醇溶液表面擦拭消毒的黄瓜上,待其产生分生孢子器后,先用少量无菌水洗下,待分生孢子充分释放出来,将孢子悬液浓度调配至 1×10^4 CFU/g,备用。用灭菌的喷壶将配制好的 1×10^4 CFU/g孢子悬液喷洒到健康的西瓜叶片上,每株喷施5 mL,以喷洒等量无菌水的西瓜叶片作对照,每个处理重复3次,透明塑料袋保湿培养,3 d后摘下塑料袋,逐日观察发病情况。

抗性突变体与其亲本菌株生长速率的测定:将已活化的抗性突变体菌株及其亲本敏感菌株在菌落边缘打取直径为8 mm的菌饼,菌丝面朝下接种到PDA平板中央,于25℃恒温、全光照、相对湿度30%条件下培养,每株菌株重复3次。每隔24 h采用十字交叉法测量菌落直径,并计算3次重复的平均数。利用Excel 2018软件以时间为横坐标,菌落平均直径为纵坐标绘制菌丝生长曲线。

高盐(NaCl)下抗性突变体及其亲本菌株生长情况的测定:将已活化的抗性突变体菌株及其亲本敏感菌株在菌落边缘打取直径为8 mm的菌饼,菌丝面朝下分别接种到含0、10、20、30、40、50、60、70、80、90 g/L NaCl的PDA平板中央,于25℃恒温、全光照、相对湿度30%条件下培养,每个处理重复3次。4 d后采用十字交叉法测量菌落直径,并计算3次重复平均数。利用Excel 2018软件以NaCl的浓度为横坐标,菌株在不同NaCl浓度下的菌落直径平均数为纵坐标绘制菌丝生长曲线。

高糖(葡萄糖)下抗性突变体及其亲本菌株生长情况的测定:将已活化的抗性突变体菌株及其亲本敏感菌株在菌落边缘打取直径为8 mm的菌饼,菌丝面朝下分别接种到含0、20、40、80、120、160、200、240、280 g/L葡萄糖的PDA平板中央,于25℃恒温、全光照、相对湿度30%条件下培养,每个处理重复3次。4 d后采用十字交叉法测量菌落直径,并计算3次重复平均数。利用Excel 2018软件以葡萄糖的浓度为横坐标,菌株在不同葡萄糖浓度下的菌落直径平均数为纵坐标绘制菌丝生长曲线。

不同温度下抗性突变体及其亲本菌株生长情况的测定:将已活化的抗性突变体菌株及其亲本敏感菌株在菌落边缘打取直径为8 mm的菌饼,菌丝面朝下接种到PDA培养基中央,将其分别于5、10、15、20、25、30、35℃恒温、全光照、相对湿度30%条件下培养,每个处理重复3次。4 d后采用十字交叉法测量菌落直径,并计算3次重复平均数。利用Excel 2018软件以温度为横坐标,菌株在不同温度下的菌落直径平均数为纵坐标绘制菌丝生长曲线。

不同pH下抗性突变体及其亲本菌株生长情况的测定:将已活化的抗性突变体菌株及其亲本敏感菌株在菌落边缘打取直径为8 mm的菌饼,菌丝面朝下分别接种到pH调节为5、6、7、8、9、10、11的PDA平板中央,25℃恒温、全光照、相对湿度30%条件下培养,每个处理重复3次。4 d后采用十字交叉

法测量菌落直径,并计算3次重复平均数。利用Excel 2018软件以pH为横坐标,菌株在不同pH下的菌落直径平均数为纵坐标绘制菌丝生长曲线。

不同光照下抗性突变体及其亲本菌株生长情况的测定:将已活化的抗性突变体菌株及其亲本敏感菌株在菌落边缘打取直径为8 mm的菌饼,菌丝面朝下接种到PDA平板中央,将其分别于24 h光照、12 h光照/12 h黑暗、24 h黑暗,25℃恒温,相对湿度30%条件下培养,每个处理设3次重复。4 d后采用十字交叉法测量菌落直径,并计算3次重复平均数。利用Excel 2018软件以光照为横坐标,菌株在不同光照下的菌落直径平均数为纵坐标绘制菌丝生长曲线。

1.2.8 交互抗性的测定

按照1.2.2方法,测定西瓜蔓枯病菌抗吡唑醚菌酯突变体及其亲本菌株对麦角甾醇生物合成抑制剂类杀菌剂戊唑醇、二甲酰亚胺类杀菌剂异菌脲、苯并咪唑类杀菌剂多菌灵、同类型甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂醚菌酯和肟菌酯的敏感性,重复3次。

以吡唑醚菌酯对抗吡唑醚菌酯突变体及其亲本菌株的 EC_{50} 为横坐标,再分别以戊唑醇、异菌脲、多菌灵、肟菌酯和醚菌酯对这些菌株的 EC_{50} 为纵坐标,利用SPSS 24.0软件对吡唑醚菌酯与各杀菌剂之间进行相关性分析,并采用 F 检验法来判断吡唑醚菌酯与这5种杀菌剂之间是否存在交互抗性(赵卫松等,2010)。

1.3 数据分析

试验数据采用SPSS 24.0软件进行统计分析,应用Duncan氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 西瓜蔓枯病菌对吡唑醚菌酯的敏感基线及抗性监测

2.1.1 西瓜蔓枯病菌对吡唑醚菌酯的敏感基线

吡唑醚菌酯对吉林省西瓜主产区西瓜蔓枯病菌的 EC_{50} 范围为0.457~3.899 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。其中松原市乾安县的 EC_{50} 范围为0.799~3.753 $\mu\text{g}/\text{mL}$,白城市洮南市为0.658~3.506 $\mu\text{g}/\text{mL}$,松原市长岭县为1.063~3.899 $\mu\text{g}/\text{mL}$,白城市通榆县为0.701~3.608 $\mu\text{g}/\text{mL}$,四平市双辽市为0.585~3.801 $\mu\text{g}/\text{mL}$,长春市农安县为0.457~2.602 $\mu\text{g}/\text{mL}$,四平市梨树县为0.972~2.880 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。其中 EC_{50} 最小值与最大值相差8.53倍。说明不同来源地西瓜蔓枯病菌的 EC_{50} 平均数均存在显著差异(表1)。

表1 吉林省西瓜蔓枯病菌对吡唑醚菌酯的敏感性

Table 1 Sensitivity distribution to pyraclostrobin in *Stagonosporopsis citrulli* collected from Jilin Province

菌株来源 Sampling place	菌株数/株 Number of stains	EC ₅₀ 范围 Range of EC ₅₀ /($\mu\text{g/mL}$)	EC ₅₀ 平均数 Mean of EC ₅₀ /($\mu\text{g/mL}$)
松原市乾安县 Qian'an County, Songyuan City	17	0.799–3.753	1.936±0.165 ab
白城市洮南市 Taonan City, Baicheng City	19	0.658–3.506	1.693±0.241 bc
松原市长岭县 Changling County, Songyuan City	25	1.063–3.899	2.357±0.612 a
白城市通榆县 Tongyu County, Baicheng City	18	0.701–3.608	2.024±0.591 ab
四平市双辽市 Shuangliao City, Siping City	29	0.585–3.801	1.428±0.194 c
长春市农安县 Nong'an County, Changchun City	29	0.457–2.602	1.400±0.155 c
四平市梨树县 Lishu County, Siping City	14	0.972–2.880	2.099±0.423 ab

表中数据为平均数±标准误。同列不同小写字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验差异显著 ($P < 0.05$)。Data are mean±SE. Different lowercase letters in the same column indicate significant difference by Duncan's new multiple range test ($P < 0.05$).

根据测定的 151 株菌株对吡唑醚菌酯的敏感性, 绘制西瓜蔓枯病菌对吡唑醚菌酯的敏感性分布图(图 1), EC₅₀平均数为 1.800 $\mu\text{g/mL}$ 。供试的 151 株西瓜蔓枯病菌对吡唑醚菌酯的敏感性频率分布呈近似正态的单峰曲线, 因此可将其 EC₅₀平均数作为吉林省西瓜蔓枯病菌对吡唑醚菌酯的敏感基线。

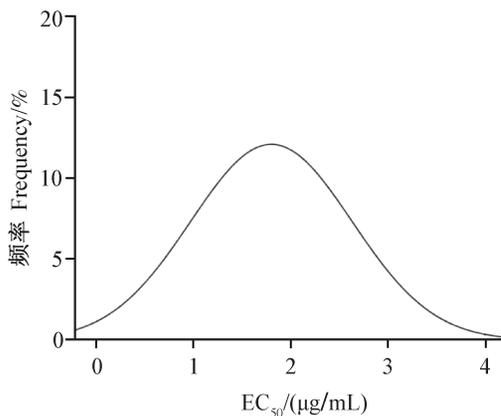


图1 吉林省西瓜蔓枯病菌对吡唑醚菌酯的敏感性频率分布
Fig. 1 Frequency distribution of sensitivity o pyraclostrobin in *Stagonosporopsis citrulli* collected from Jilin Province

2.1.2 西瓜蔓枯病菌对吡唑醚菌酯的抗性监测

通过菌丝生长速率法测定吡唑醚菌酯对供试的

151 株菌株的 MIC 值, 确定其范围在 70~80 $\mu\text{g/mL}$ 之间。结合其敏感基线以及测得的 MIC 值, 最终将 80.000 $\mu\text{g/mL}$ 作为最终的 MIC 浓度。抗性监测结果显示, 供试的 375 株西瓜蔓枯病菌菌株对吡唑醚菌酯均敏感, 且未监测到抗性菌株, 抗性频率为 0。

2.2 西瓜蔓枯病菌对吡唑醚菌酯的抗性风险评估

2.2.1 西瓜蔓枯病菌抗吡唑醚菌酯突变体的获得

亲本菌株 LH3-1 和 XZC5-1 经过药剂驯化后, 得到 2 株疑似抗性突变体 T-LH3-1 和 T-XZC5-1。T-LH3-1 和 T-XZC5-1 的 EC₅₀ 分别为 20.993 $\mu\text{g/mL}$ 和 34.696 $\mu\text{g/mL}$; 抗性倍数分别为 20 和 56(表 2), 均为中抗菌株。

2.2.2 抗性突变体遗传稳定性测定结果

将获得的 2 株抗性突变体连续转接培养 8 代, 用菌丝生长速率法测定它们每代的 EC₅₀ 值并计算抗性倍数, 判断它们的遗传稳定性。在连续转接培养 8 代后吡唑醚菌酯对抗性突变体 T-LH3-1 和 T-XZC5-1 的 EC₅₀ 分别为 16.139 $\mu\text{g/mL}$ 和 31.782 $\mu\text{g/mL}$; 抗性倍数分别为 15 和 51(表 3)。虽然相对于初始抗性倍数有所下降, 但依然保持中抗水平, 可以确定西瓜蔓枯病菌对吡唑醚菌酯的抗性水平能稳定遗传。

表2 吡唑醚菌酯抗性突变体及其亲本菌株的 EC₅₀ 及抗性倍数Table 2 EC₅₀ and resistance multiple of *Stagonosporopsis citrulli* pyraclostrobin-resistant mutants and their parent strains

菌株 Strain	相关系数 Relative coefficient	毒力回归方程 Regression equation	EC ₅₀ /($\mu\text{g/mL}$)	抗性倍数 Resistance multiple
LH3-1	0.974	$y=0.967x-0.024$	1.063	-
T-LH3-1	0.998	$y=0.636x-0.841$	20.993	20
XZC5-1	0.988	$y=1.0228x+0.210$	0.624	-
T-XZC5-1	0.991	$y=0.579x-0.892$	34.696	56

2.2.3 抗性突变体及其亲本菌株的生长速率

每隔 24 h 对各供试菌株的菌丝生长速率进行测

定, 得到菌丝生长曲线(图 2)。抗性突变体 T-XZC5-1 的生长速率最慢, 亲本菌株 XZC5-1 的生长速率最

快;抗性突变体 T-LH3-1 和 T-XZC5-1 的生长速率均小于其亲本菌株 LH3-1 和 XZC5-1,但差异不显著。

表3 吡唑醚菌酯抗性突变体连续转接培养后 EC₅₀ 和抗性倍数的变化

Table 3 The changes of EC₅₀ and resistance multiple of *Stagonosporopsis citrulli* pyraclostrobin-resistant mutants after continuous transference

菌株 Strain	转接代数 Switching algebra	EC ₅₀ /($\mu\text{g/mL}$)	抗性倍数 Resistance multiple
T-LH3-1	2	19.444	18
	4	18.627	18
	6	16.849	16
	8	16.139	15
T-XZC5-1	2	32.915	53
	4	33.497	54
	6	32.239	52
	8	31.782	51

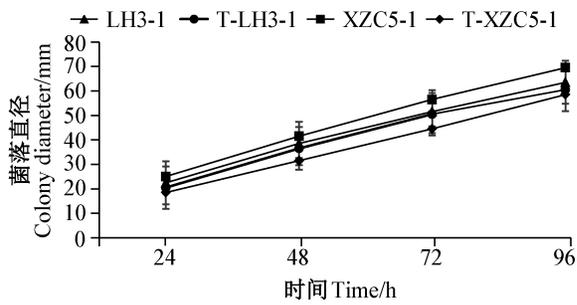


图2 抗性突变体及其亲本菌株的生长曲线

Fig. 2 Colony growth curve of resistant mutants and their parental strains

图中数据为平均数±标准误。各处理之间经 Duncan 氏新复极差法检验均无显著差异 ($P>0.05$)。Data are mean±SE. No significant difference among different treatments by Duncan's new multiple range test ($P>0.05$).

2.2.4 高盐下抗性突变体及其亲本菌株生长状况

在低浓度 NaCl 处理下,抗性突变体 T-LH3-1 和 T-XZC5-1 的菌落直径均小于亲本菌株 LH3-1 和 XZC5-1 的菌落直径;但随着 NaCl 浓度升高,当浓度为 10 g/L 时,抗性突变体 T-LH3-1 的菌落直径开始大于其亲本菌株 LH3-1,当浓度为 30 g/L 时,抗性突变体 T-XZC5-1 的菌落直径开始大于其亲本菌株 XZC5-1(图3)。抗性突变体对高浓度 NaCl 的耐受程度要强于敏感菌株,但均未达到显著水平。

2.2.5 高糖下抗性突变体及其亲本菌株生长状况

随着葡萄糖浓度持续升高,抗性突变体及其亲本菌株的菌落直径均呈下降趋势(图4)。当葡萄糖浓度为 80 g/L 时,所有菌株的菌落直径均达最大值;抗性突变体 T-XZC5-1 在所有葡萄糖浓度下其菌落

直径均小于亲本菌株 XZC5-1,且差异显著;当葡萄糖浓度介于 0~60 g/L 之间时,抗性突变体 T-LH3-1 的菌落直径和亲本菌株 LH3-1 的菌落直径基本相当,在葡萄糖浓度大于 60 g/L 时抗性突变体 T-LH3-1 的菌落直径大于亲本菌株 LH3-1 的菌落直径,但差异性不显著。

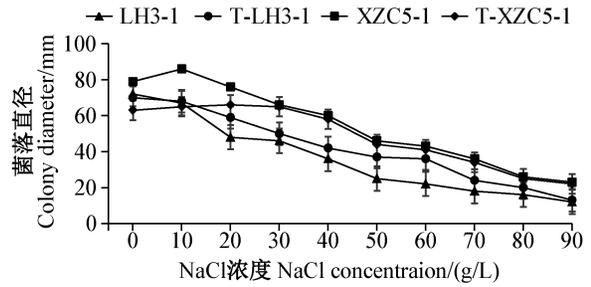


图3 不同盐浓度下抗性突变体及其亲本菌株的生长状况

Fig. 3 The mycelium growth of resistant mutants and their parental strains at different NaCl concentrations

图中数据为平均数±标准误。各处理之间经 Duncan 氏新复极差法检验均无显著差异 ($P>0.05$)。Data are mean±SE. No significant difference among different treatments by Duncan's new multiple range test ($P>0.05$).

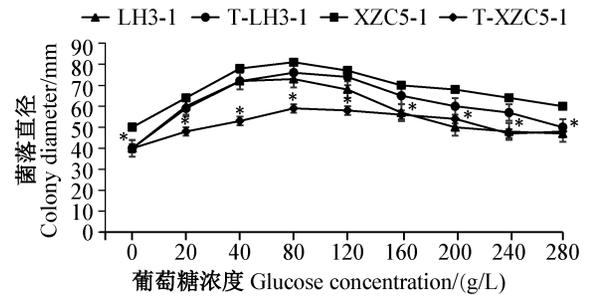


图4 不同葡萄糖浓度下抗性突变体及其亲本菌株的生长状况

Fig. 4 The mycelium growth of resistant mutants and their parental strains at different glucose concentrations

图中数据为平均数±标准误。* 表示各处理之间经 Duncan 氏新复极差法检验差异显著 ($P<0.05$)。Data are mean±SE. * indicates that significant difference among different treatments by Duncan's new multiple range test ($P<0.05$).

2.2.6 不同温度下抗性突变体及其亲本菌株生长状况

抗性突变体及其亲本菌株的菌落直径均在 25℃ 时达到最大值;在所测温度下,抗性突变体 T-XZC5-1 和 T-LH3-1 的菌落直径均小于亲本菌株 XZC5-1 和 LH3-1 的菌落直径,但差异均不显著(图5)。

2.2.7 不同 pH 下抗性突变体及其亲本菌株生长状况

突变菌株 T-LH3-1 的菌落直径除 pH 为 5、6 和 11 时略大于亲本菌株 LH3-1 外,其他 pH 下均小于亲本菌株 LH3-1 的菌落直径;突变体 T-XZC5-1 的菌落直径除 pH 小于等于 7 时略大于亲本菌株 XZC5-1

外,其余 pH 下均小于亲本菌株 XZC5-1 的菌落直径(图 6)。说明抗性突变体较亲本菌株对酸碱的适应能力略低,但差异均不显著。

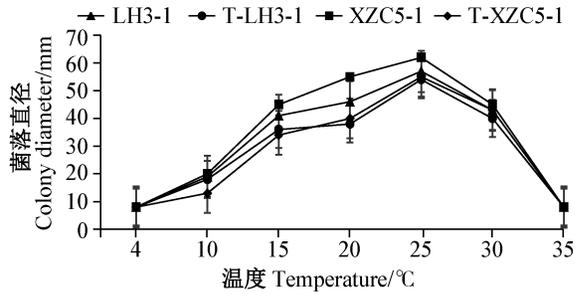


图 5 不同温度下抗性突变体及其亲本菌株的生长状况

Fig. 5 The mycelium growth of resistant mutants and their parental strains under different temperatures

图中数据为平均数±标准误。各处理之间经 Duncan 氏新复极差法检验均无显著差异 ($P>0.05$)。Data are mean±SE. No significant difference among different treatments by Duncan's new multiple range test ($P>0.05$).

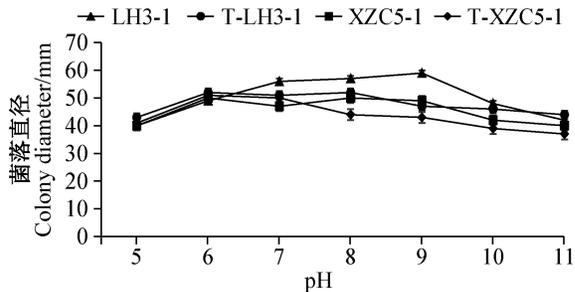


图 6 不同 pH 下抗性突变体及其亲本菌株的生长状况

Fig. 6 The mycelium growth of resistant mutants and their parental strains under different pHs

图中数据为平均数±标准误。各处理之间经 Duncan 氏新复极差法检验均无显著差异 ($P>0.05$)。Data are mean±SE. No significant difference among different treatments by Duncan's new multiple range test ($P>0.05$).

2.2.8 不同光照下抗性突变体及其亲本菌株生长状况

在 24 h 光照、12 h 光照/12 h 黑暗和 24 h 黑暗的条件下,所有供试菌株的菌落直径基本一致(图 7)。说明抗性突变体与其亲本菌株对光线的敏感程度无显著差异。

2.2.9 交互抗性的测定

吡唑醚菌酯与其他 5 种杀菌剂之间的交互抗性测定结果表明,戊唑醇、异菌脲、多菌灵和肟菌酯对抗性突变体 T-LH3-1 和 T-XZC5-1 及其亲本菌株 LH3-1 和 XZC5-1 的 EC_{50} 之间相差较小,但醚菌酯对抗性突变体的 EC_{50} 较其亲本菌株的 EC_{50} 之间相差倍数较大(表 4)。吡唑醚菌酯与戊唑醇、异菌脲、多菌灵、肟菌酯和醚菌酯在 F 检验下的显著性水平 P 值

分别为 0.853、0.557、0.562、0.476 和 0.043,因此吡唑醚菌酯与戊唑醇、异菌脲、多菌灵和肟菌酯之间不存在交互抗性,与醚菌酯之间存在正交互抗性(图 8)。

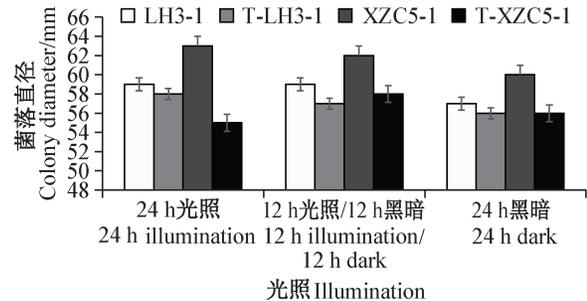


图 7 不同光照下抗性突变体及其亲本菌株的生长状况

Fig. 7 The mycelium growth of resistant mutants and their parental strains under different illumination conditions

图中数据为平均数±标准误。各处理之间经 Duncan 氏新复极差法检验均无显著差异 ($P>0.05$)。Data are mean±SE. No significant difference among different treatments by Duncan's new multiple range test ($P>0.05$).

3 讨论

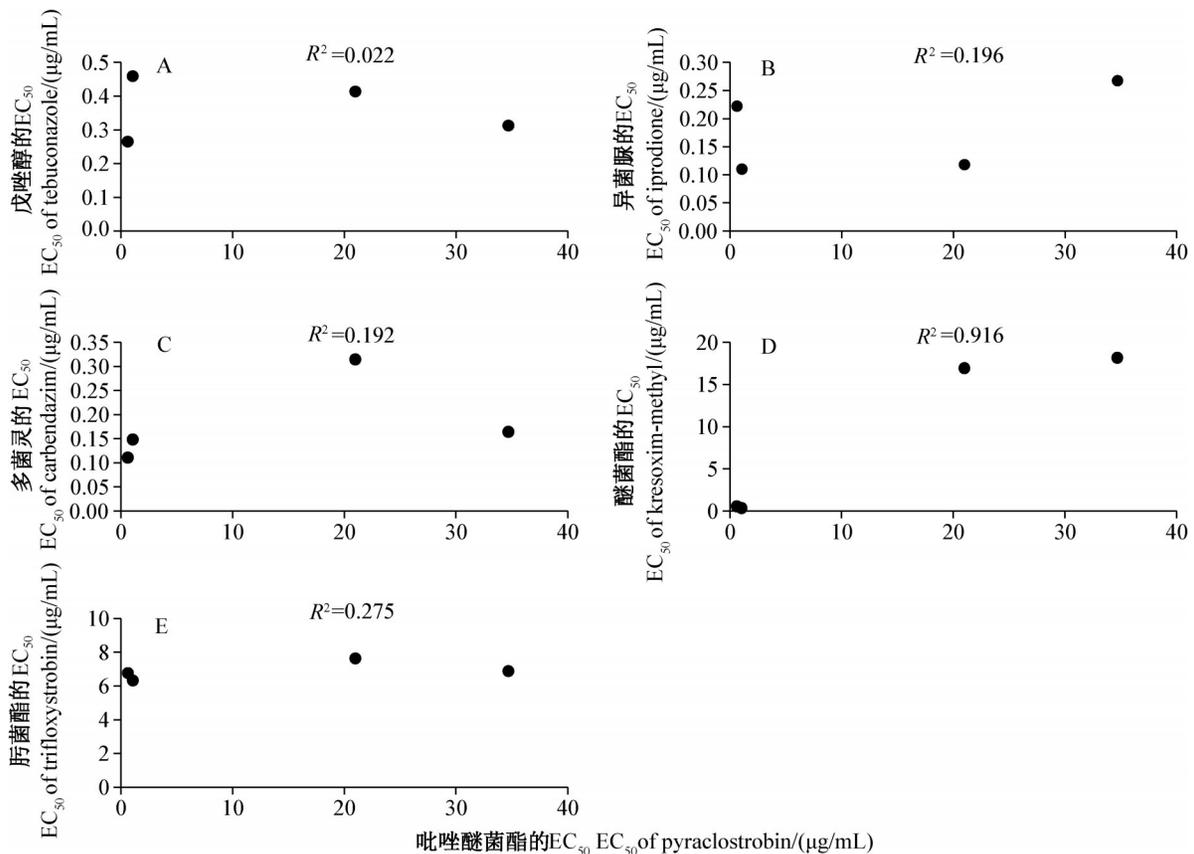
西瓜蔓枯病是西瓜生产上的重要病害之一,吡唑醚菌酯被广泛用于吉林省西瓜蔓枯病的防治,及时了解西瓜蔓枯病菌对吡唑醚菌酯的抗性以及对吡唑醚菌酯进行抗性风险评估对药剂的合理使用尤为重要。本研究结果显示,吡唑醚菌酯对吉林省 7 个西瓜主产区中 151 株西瓜蔓枯病菌的 EC_{50} 为 0.457~3.899 $\mu\text{g}/\text{mL}$,虽然各地区菌株之间存在敏感性差异,但 EC_{50} 范围相对较窄,最大值与最小值相差倍数为 8.53 倍,可能由于不同地区吡唑醚菌酯用量及菌株之间存在差异,总体来说,吡唑醚菌酯对西瓜蔓枯病菌有较高的抑制活性。

根据 151 株西瓜蔓枯病菌对吡唑醚菌酯的敏感基线及吡唑醚菌酯对 151 株西瓜蔓枯病菌的 MIC 值确定蔓枯病菌对吡唑醚菌酯的抗性监测标准浓度为 80.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。吉林省 7 个西瓜主产区 375 株西瓜蔓枯病菌对吡唑醚菌酯的抗性频率为 0,说明该药剂对吉林省西瓜蔓枯病菌具有较高的生物活性。刘顺涛(2016)研究结果表明重庆市、贵州省西瓜蔓枯病菌对多菌灵已经产生极高的抗性水平,抗性频率高达 69.2%,对苯醚甲环唑的抗性水平虽较低,但抗性频率也有 2.88%。因此吡唑醚菌酯可作为代替多菌灵,或与苯醚甲环唑等杀菌剂轮换使用对西瓜蔓枯病进行防治,也可作为多菌灵抗性治理的杀菌剂使用。

表4 吡唑醚菌酯抗性突变体对不同药剂的敏感性

Table 4 Sensitivity of *Stagonosporopsis citrulli* pyraclostrobin-resistant mutants to different fungicides

杀菌剂 Fungicide	菌株 Strain	EC ₅₀ /(μg/mL)	毒力回归方程 Regression equation	相关系数 Relative coefficient
戊唑醇 Tebuconazole	LH3-1	0.459	$y=0.425x+5.164$	0.904
	T-LH3-1	0.413	$y=0.338x+5.164$	0.918
	XZC5-1	0.265	$y=0.315x+5.187$	0.880
异菌脲 Iprodione	T-XZC5-1	0.312	$y=0.491x+5.236$	0.959
	LH3-1	0.110	$y=0.385x+5.331$	0.968
多菌灵 Carbendazim	T-LH3-1	0.118	$y=0.377x+5.348$	0.906
	XZC5-1	0.222	$y=0.281x+5.185$	0.904
	T-XZC5-1	0.267	$y=0.293x+5.165$	0.934
醚菌酯 Kresoxim-methyl	LH3-1	1.482	$y=0.434x+4.928$	0.897
	T-LH3-1	3.143	$y=0.464x+4.760$	0.946
	XZC5-1	1.107	$y=0.514x+4.985$	0.898
肟菌酯 Trifloxystrobin	T-XZC5-1	1.643	$y=0.295x+4.937$	0.912
	LH3-1	0.339	$y=0.373x+5.164$	0.999
	T-LH3-1	16.924	$y=0.643x+4.216$	0.931
吡唑醚菌酯	XZC5-1	0.543	$y=0.605x+5.152$	0.999
	T-XZC5-1	18.164	$y=0.422x+4.471$	0.949
	LH3-1	6.319	$y=0.509x+4.557$	0.981
吡唑醚菌酯	T-LH3-1	7.621	$y=0.244x+4.787$	0.824
	XZC5-1	6.759	$y=0.481x+4.594$	0.976
	T-XZC5-1	6.882	$y=0.316x+4.673$	0.908

图8 吡唑醚菌酯EC₅₀与戊唑醇(A)、异菌脲(B)、多菌灵(C)、醚菌酯(D)和肟菌酯(E)EC₅₀的相关性分析Fig. 8 The correlation analysis between EC₅₀ to pyraclostrobin and EC₅₀ to tebuconazole (A), iprodione (B), carbendazim (C), kresoxim-methyl (D) and trifloxystrobin (E)

本研究通过药剂驯化获得了2株中抗突变菌株T-LH3-1和T-XZC5-1,在连续转接培养8代后,抗性倍数分别为15和51,虽较初代菌株的抗性倍数有所下降但是仍保持着中抗水平,说明突变菌株的抗药性可稳定遗传,这与王帅(2018)和陈杰(2015)对吡唑醚菌酯突变体抗药性的研究结果一致。

Ziogas et al.(2003)研究表明抗药性的产生会导致病原菌生物学特性发生变化,所以生物学特性测定是抗药性风险评估的一个重要指标。本研究获得的2株抗性突变菌株与亲本菌株在致病性上没有明显差别。抗性突变体的生长速率与亲本菌株持平或略低,这一试验结果与杨石有等(2020)研究的拟轮枝镰孢菌*Fusarium verticillioides*抗多菌灵突变体的菌丝生长速率显著低于其亲本菌株的结果基本一致,说明在适宜条件下抗性群体的竞争力要弱于敏感菌株群体;2株抗性突变菌株对NaCl的耐受程度均强于其亲本菌株;突变菌株与亲本菌株对葡萄糖的耐受程度没有相关性;突变菌株在低于15℃、高于30℃的条件下生长速率下降较敏感菌株缓慢,说明抗性群体对温度的适应性能力较强;抗性突变体在适宜的pH条件下适应力弱于亲本菌株,但在高酸高碱条件下要强于亲本菌株;抗性突变体对光照的敏感程度与亲本菌株无明显差异。上述研究结果表明抗性突变体的生物适合度略低于亲本菌株,但在特定条件下抗性突变体也可能形成优势菌群,此结果与王少秋等(2017)研究的西瓜蔓枯病菌抗啶酰菌胺突变体与敏感菌株相比并无竞争优势的这一结论一致,因此吡唑醚菌酯为中等抗性风险杀菌剂。

测定杀菌剂之间是否存在交互抗性,可以为杀菌剂的合理使用、风险评估、抗性治理等提供理论参考。因此本试验选择了吡唑醚菌酯同类型的杀菌剂醚菌酯、肟菌酯以及其他3种不同类型的杀菌剂戊唑醇、异菌脲、多菌灵。测定结果表明吡唑醚菌酯与醚菌酯之间存在正交互抗性,与戊唑醇、异菌脲、多菌灵、肟菌酯之间不存在交互抗性。这与西南地区稻瘟病菌*Magnaporthe grisea*抗吡唑醚菌酯突变体对醚菌酯有正交互抗性(陈杰,2015)、长江中下游地区稻瘟病菌抗吡唑醚菌酯突变体对甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂有正交互抗性(梁梦琦,2018)的结果一致。因此在药防治西瓜蔓枯病时应避免甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂之间交叉使用,严格按照杀菌剂推荐剂量合理用药,并与其他药剂如戊唑醇、异菌脲等轮换使用,以减缓西瓜蔓枯病菌抗药性的产生。

参 考 文 献 (References)

- Avenot H, Morgan DP, Michailides TJ. 2008. Resistance to pyraclostrobin, boscalid and multiple resistance to Pristine® (pyraclostrobin+boscalid) fungicide in *Alternaria alternata* causing *Alternaria* late blight of pistachios in California. *Plant Pathology*, 57(1): 135-140
- Avenot HF, Michailides TJ. 2015. Detection of isolates of *Alternaria alternata* with multiple-resistance to fludioxonil, cyprodinil, boscalid and pyraclostrobin in California pistachio orchards. *Crop Protection*, 78: 214-221
- Chen J. 2015. Monitoring and mechanisms of resistance to isoprothiolane and pyraclostrobin by *Magnaporthe grisea* in Southwest China. Master thesis. Chongqing: Southwest University (in Chinese) [陈杰. 2015. 西南地区稻瘟病菌对稻瘟灵和吡唑醚菌酯的抗性监测及抗性机理. 硕士学位论文. 重庆: 西南大学]
- Chen JF, Ren ZH, Peng WY, Liu X, Zou Q, Liu EM. 2016. Joint-toxicity of mixtures of pyraclostrobin with thiophanate-methyl against two kinds of *Colletotrichum* spp. *Modern Agrochemicals*, 15(1): 44-47, 50 (in Chinese) [陈娟芳, 任佐华, 彭伟业, 刘翔, 邹茜, 刘二明. 2016. 吡唑醚菌酯和甲基硫菌灵对2种辣椒炭疽病菌的联合毒力测定. 现代农药, 15(1): 44-47, 50]
- Chen ML, Ji MS, Zhao L, Qi ZQ, Wang F. 2008. Baseline sensitivity and resistance risk of *Magnaporthe grisea* to enestroburin in Liaoning Province. *Modern Agrochemicals*, 7(2): 23-25, 32 (in Chinese) [陈明丽, 纪明山, 赵琳, 祁之秋, 王芳. 2008. 辽宁省稻瘟病菌对烯肟菌酯敏感基线及抗药性风险研究. 现代农药, 7(2): 23-25, 32]
- Diao YJ. 2017. The resistance of *Peronophythora litchi* to krexiomethyl and pyraclostrobin. Master thesis. Guangzhou: South China Agricultural University (in Chinese) [刁伊珺. 2017. 荔枝霜疫霉对醚菌酯和吡唑醚菌酯的抗药性研究. 硕士学位论文. 广州: 华南农业大学]
- Fan Z, Yang JH, Fan F, Luo CX, Schnabel G. 2015. Fitness and competitive ability of *Alternaria alternata* field isolates with resistance to SDHI, QoI, and MBC fungicides. *Plant Disease*, 99(12): 1744-1750
- Gao XJ, Wang HL, Ma YH, Chen W, Qin GY, Song YJ. 2017. Resistance of *Capsella bursa-pastoris* to tribenuron-methyl in winter wheat fields in some areas of Henan Province and its molecular mechanism. *Journal of Plant Protection*, 44(3): 501-508 (in Chinese) [高新菊, 王恒亮, 马毅辉, 陈威, 秦光宇, 宋语娇. 2017. 河南省部分地区麦田荠菜对苯磺隆的抗性水平及抗性靶标分子机制. 植物保护学报, 44(3): 501-508]
- Gao YY, He LF, Mu W, Li BX, Lin J, Liu F. 2018. Assessment of the baseline sensitivity and resistance risk of *Colletotrichum acutatum* to fludioxonil. *European Journal of Plant Pathology*, 150(3): 639-651
- Liang MQ. 2018. Monitoring sensitivity of *Magnaporthe oryzae* to isoprothiolane and pyraclostrobin in middle and lower reaches of Yangtze River. Master thesis. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences (in Chinese) [梁梦琦. 2018. 长江中下游稻区稻

- 瘟病菌对稻瘟灵和吡唑醚菌酯的抗性监测. 硕士学位论文. 北京: 中国农业科学院]
- Liu ST. 2016. Monitoring and carbendazim mechanisms of resistance to difenoconazole and carbendazim by *Didymella bryoniae* in the region of Chongqing and Guizhou. Master thesis. Chongqing: Southwest University (in Chinese) [刘顺涛. 2016. 渝贵地区西瓜蔓枯病菌对多菌灵和苯醚甲环唑抗性监测及对多菌灵的抗性机理. 硕士学位论文. 重庆: 西南大学]
- Ren L, Zhao BB, Han JC, Liu HQ, Liu HP. 2015. Sensitivity of *Podosphaera xanthii* to thiophanate-methyl and characteristics of resistant mutants. *Journal of Plant Protection*, 42(2): 176–181 (in Chinese) [任璐, 赵彬彬, 韩巨才, 刘慧芹, 刘慧平. 2015. 黄瓜白粉病菌对甲基硫菌灵的敏感性及其室内抗性突变体生物学性状. 植物保护学报, 42(2): 176–181]
- Stewart JE, Turner AN, Brewer MT. 2015. Evolutionary history and variation in host range of three *Stagonosporopsis* species causing gummy stem blight of cucurbits. *Fungal Biology*, 119(5): 370–382
- Wang JX, Zhou MG, Lu YJ, Ye ZY. 2002. Dynamics of resistant population of *Fusarium graminearum* to carbendazim and substitutable fungicide screening. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 25(1): 43–47 (in Chinese) [王建新, 周明国, 陆悦健, 叶钟音. 2002. 小麦赤霉病菌抗药性群体动态及其治理药剂. 南京农业大学学报, 25(1): 43–47]
- Wang S. 2018. Resistance risk assessment of *Valsa mali* to pyraclostrobin and antifungal activity of biological fungicides. Master thesis. Yangling: Northwest A&F University (in Chinese) [王帅. 2018. 苹果树腐烂病菌对吡唑醚菌酯的抗药性风险评估及生物源杀菌剂的室内活性评价. 硕士学位论文. 杨凌: 西北农林科技大学]
- Wang SQ, Li Y, Yang YH, Yu Y, Bi ZW. 2017. Study on biological characteristics and resistance molecular mechanism of *Didymella bryoniae* to boscalid. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 19(3): 307–315 (in Chinese) [王少秋, 李雨, 杨宇衡, 余洋, 毕朝位. 2017. 西瓜蔓枯病菌唑啉酰胺抗性突变体的生物学特性研究及其 *Sdh B* 基因位点检测. 农药学报, 19(3): 307–315]
- Xiao T, Cheng W, Yang WZ, Wang JH, Xu Y, Ji MY, Yang JH. 2018. Fungicide resistance of *Botrytis cinerea* isolated from strawberry in Shanghai area. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 46(20): 117–120 (in Chinese) [肖婷, 成玮, 颜伟中, 王建华, 许媛, 吉沐祥, 杨敬辉. 2018. 上海地区草莓灰霉病菌种群抗药性研究. 江苏农业科学, 46(20): 117–120]
- Xiao T, Xu Y, Chen HZ, Di HT, Ji MX, Yang JH. 2017. Resistance to QoIs fungicides in *Botrytis cinerea* populations for strawberries in hilly area of Jiangsu. *Journal of Fruit Science*, 34(5): 603–610 (in Chinese) [肖婷, 许媛, 陈宏州, 狄华涛, 吉沐祥, 杨敬辉. 2017. 江苏丘陵地区草莓灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)对QoIs类杀菌剂的抗药性研究. 果树学报, 34(5): 603–610]
- Yang SY, Liu QY, Wan YM, Guo CC, Pang MH, Liu YC, Dong JG. 2020. Sensitivity of *Fusarium verticillioides* to carbendazim and biological characteristics of resistant isolates and cross resistance. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 22(3): 439–446 (in Chinese) [杨石有, 刘倩宇, 万亚美, 郭聪聪, 庞民好, 刘颖超, 董金泉. 2020. 拟轮枝镰孢对多菌灵的敏感性及其抗性菌株生物学性状和交互抗性. 农药学报, 22(3): 439–446]
- Zhao WS, Han XY, Wang WQ, Qi YZ, Ma ZQ, Zhang XF. 2010. The sensitivity of *Phytophthora capsici* to metalaxyl and cross resistance between fungicides. *Agrochemicals*, 49(6): 445–447 (in Chinese) [赵卫松, 韩秀英, 王文桥, 齐永志, 马志强, 张小凤. 2010. 辣椒疫霉菌对甲霜灵的敏感性和不同杀菌剂的交互抗性. 农药, 49(6): 445–447]
- Zhao YJ, Li BJ, Shi YX, Ben HY. 2008. Occurrence and control of vine blight. *China Vegetables*, (2): 56–57 (in Chinese) [赵彦杰, 李宝聚, 石延霞, 贲海燕. 2008. 瓜类蔓枯病的发生与防治. 中国蔬菜, (2): 56–57]
- Ziogas BN, Markoglou AN, Malandrakis AA. 2003. Studies on the inherent resistance risk to fenhexanmid in *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 109(4): 311–317

(责任编辑:王璇)