

• 研究论文 •

番茄叶霉病菌异菌脲抗药性突变体的诱导与生物学性状

张传清^{* 1 2}, 马忠华², 朱国念²

(1. 浙江林学院 农业与食品科学学院, 杭州 311300 2. 浙江大学 农业与生物技术学院, 杭州 310029)

摘要: 测定了苯并咪唑类杀菌剂敏感-乙霉威抗性 ($\text{Ben}^{\text{S}}\text{-D ie}^{\text{R}}$)、苯并咪唑类杀菌剂抗性-乙霉威敏感 ($\text{Ben}^{\text{R}}\text{-D ie}^{\text{S}}$) 和苯并咪唑类杀菌剂抗性-乙霉威抗性 ($\text{Ben}^{\text{R}}\text{-D ie}^{\text{R}}$) 3 种类型的番茄叶霉病菌 *Cladosporium fulvum* 菌株对不同药剂的敏感性。结果表明, 蕃茄叶霉病菌对供试药剂的敏感性与其对苯并咪唑类杀菌剂及乙霉威的敏感性无关。根据药剂对 3 类菌株 EC_{50} 值的平均值, 16 种杀菌剂抑制菌丝生长的活性依次为 腐霉利 > 乙烯菌核利 > 异菌脲 > 戊唑醇 > 百菌清 > 啞霉胺 > 醚菌酯 > 代森锰锌 > 8-羟基喹啉铜 > 丙环唑 > 苯醚甲环唑 > 啞菌酯 > 灭锈胺 > 烯酰吗啉 > 烟酰胺 > 三唑酮; 抑制孢子萌发的活性依次为 醚菌酯 > 腐霉利 > 百菌清 > 乙烯菌核利 > 灭锈胺 > 8-羟基喹啉铜 > 异菌脲 > 代森锰锌 > 啞菌酯 > 烟酰胺 > 啞霉胺 > 戊唑醇 > 丙环唑 > 苯醚甲环唑 > 三唑酮 > 烯酰吗啉。通过紫外诱变共获得 17 株抗异菌脲突变体, 突变频率为 4.5×10^{-7} 。其中低抗、中抗和高抗菌株分别占 17.63%、70.59% 和 11.73%。这些突变体对腐霉利和乙烯菌核利表现交互抗性, 对苯并咪唑类、脱甲基抑制剂 (DMI)、QoIs 等药剂的敏感性与亲本菌株之间没有显著性差异, 与亲本菌株在生长、产孢、致病能力等方面也无显著差异, 但对渗透胁迫的敏感性要显著高于亲本。

关键词: 番茄叶霉病菌; 杀菌剂筛选; 异菌脲; 抗药性突变体

中图分类号: S481.4

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2008)03-0303-08

Induction and Characterization of Iprodione-resistant Mutants of *Cladosporium fulvum*

ZHANG Chuan-qing^{* 1 2}, MA Zhong-hua², ZHU Guo-nian²

(1. College of Agriculture and Food Science, Zhejiang Forest University, Hangzhou 311300 China;

2 College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029 China)

Abstract Sensitivity of three phenotypes of *Cladosporium fulvum* isolates, namely benzimidazole sensitive-diethofencarb resistant ($\text{Ben}^{\text{S}}\text{-D ie}^{\text{R}}$), benzimidazole resistant-diethofencarb sensitive ($\text{Ben}^{\text{R}}\text{-D ie}^{\text{S}}$) and benzimidazole resistant-diethofencarb resistant ($\text{Ben}^{\text{R}}\text{-D ie}^{\text{R}}$), to different classes of fungicides was determined. The results showed that there was no relationship between the sensitivity of *C. fulvum* to benzimidazole, diethofencarb and to other fungicides. Activity of mycelial growth inhibition of the 16 fungicides against *C. fulvum* was procymidone > vinclozolin > iprodione > tebuconazole > chlorothalnil > pyrimethanil > kresoxim-methyl > mancozeb > 8-hydroxyquinoline copper(II) salt > propiconazole >

收稿日期: 2008-03-19 修回日期: 2008-04-23

作者简介: * 张传清 (1977-), 男, 湖北人, 通讯作者 (Author for correspondence), 博士, 讲师, 从事杀菌剂毒理学与抗药性研究。联系电话:

0571-63742089 E-mail: cqzhang9603@yahoo.com.cn

基金项目: 浙江林学院发展基金 (2351000791) 资助。

difenoconazole> azoxystrobin> mepronil> dimethomorph> boscalid> triadimefon. Activity of spore germination inhibition was kresoxim-methyl> procymidone> chlorothalonil> vinclozolin> mepronil> 8-hydroxyquinoline copper (II) salt> iprodione> mancozeb> azoxystrobin> boscalid> pyrimethanil> tebuconazole> propiconazole> difenoconazole> triadimefon> dimethomorph. A total of 17 iprodione-resistant mutants was isolated through UV irradiation with a mutation frequency of 4.5×10^{-7} . Among them, the percentage of low level resistant mutants, moderate level resistant mutants and high level resistant mutants was 17.63%, 70.59% and 11.75%, respectively. All mutants showed cross-resistance to procymidone and vinclozolin. No significant difference in sensitivity was detected between these mutants and their parent to other fungicides such as benzimidazoles, DMIs and QoIs. There was no significant difference in growth, sporulation and pathogenicity between mutants and their parent too. However, these mutants were more sensitivity to osmotic stress than their parent.

Key words *Cladosporium fulvum*; fungicide screen; iprodione; fungicide resistant mutants

番茄叶霉病是为害番茄的一种世界性病害。我国华北、东北地区发病较重, 20世纪 80年代以来, 随着设施栽培的推广, 该病的发生越来越广。番茄叶霉病菌 *Cladosporium fulvum* 主要为害叶片, 多在番茄生长的中后期发生。由于该病菌生理小种组成复杂, 变异速度快, 极易导致抗病品种抗病性的丧失^[1]。长期以来, 该病一直以化学防治为主。我国只有以甲基硫菌灵为代表的苯并咪唑类杀菌剂登记用于该病的防治, 由于药剂的长期单一使用, 该病菌已对其产生了严重的抗性。王美琴等的研究表明, 山西晋南地区多菌灵抗性频率达 97.4%, 多菌灵-乙霉威双重抗性频率达 49.2%^[2]。笔者前期的研究表明, 浙江、江苏地区设施番茄叶霉病菌对多菌灵的抗性也达 71.9%, 多菌灵-乙霉威双重抗性频率达 64.7%^[3]。

目前鲜有针对抗性叶霉病进行药剂治理的系统研究。生产上仍继续使用苯并咪唑类杀菌剂, 但防治效果差, 不仅带来了严重的经济损失, 更造成了环境和农产品的污染。本研究在对防治抗性番茄叶霉病菌的药剂进行全面筛选的基础上, 通过紫外诱导获得了其异菌脲抗性突变体并描述了其生物学性状。

1 材料与方法

1.1 供试菌株及其培养条件

3株叶霉病菌 *Cladosporium fulvum* 为 2006年采自浙江杭州设施番茄的单分生孢子菌株, 在 4℃下保存于马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 斜面上。其中 CF-23 为苯并咪唑类杀菌剂敏感-乙霉威抗性 (Ben^S-Die^R), CF-18 为苯并咪唑类杀菌剂抗性-乙霉威敏感 (Ben^R-Die^S), CF-12 为苯并咪唑类杀

菌剂抗性-乙霉威抗性 (Ben^R-Die^R)^[3,4]。

1.2 供试药剂

50% 烟酰胺水分散粒剂 (boscalid WG) 由巴斯夫 (中国) 提供, 93% 嘧菌酯原药 (azoxystrobin) 由先正达公司提供, 98% 代森锰锌 (mancozeb)、98% 醚菌酯 (kresoxim-methyl)、95% 百菌清 (chlorothalonil)、98% 多菌灵 (carbendazim)、98.1% 腐霉利 (procymidone)、96% 乙烯菌核利 (vinclozolin)、96% 异菌脲 (iprodione)、95.2% 乙霉威 (diethofencarb)、95% 三唑酮 (triadimefon)、98% 戊唑醇 (tebuconazole)、95% 苯醚甲环唑 (difenoconazole)、95% 丙环唑 (propiconazole)、95% 烯酰吗啉 (dimethomorph) 和 98% 嘧霉胺 (pyrimethanil) 原药均由农业部农药检定所提供, 95% 灭锈胺 (mepiconil) 和 95% 8-羟基喹啉铜 (8-hydroxyquinoline copper (II) salt) 原药由浙江大学农药与环境毒理研究所提供。所有药剂均用丙酮或者甲醇等溶剂配制成 10 mg/mL 的母液备用。

1.3 防治番茄叶霉病菌药剂的室内筛选

1.3.1 菌丝生长速率法 各药剂根据预试验结果设置 5~7 个处理浓度。各菌株先在 PDA 平板上培养 5 d, 然后在同一圆周上制取菌丝块 (直径 0.5 cm) 接种到含不同浓度供试药剂的平板中央, 分别以不含药剂但含相同有机溶剂的平板为对照 (CK), 每处理重复 3 次, 整个实验重复 2 次。嘧霉胺的测定采用 LA sn 合成培养基 (K_2HPO_4 1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g, KCl 0.5 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g, LA sn 2 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 去离子水 1 L)^[5], 其他均采用 PDA 培养基。于 25℃ 黑暗培养 4 d 后测量各处理的菌落直径 (cm), 取平均值计算抑制率 (%), 通过浓度对数值 (X) 和抑制率率值 (Y) 之间的线性回归关系求出毒力回归方程和 EC_{50} 值。

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\text{CK 的菌落直径} - \text{处理的菌落直径}}{\text{CK 的菌落直径} - 0.5} \times 100$$

1.3.2 孢子萌发抑制率法 各药剂根据预试验结果设置 5~7 个处理浓度, 分别以不含药剂但含相同有机溶剂的处理为对照(CK), 每处理重复 4 次, 整个实验重复 2 次。各菌株在 PDA 平板上培养 7 d 后, 用无菌水洗下分生孢子即得分生孢子悬浮液, 并调节浓度至每 mL 含 1×10^5 个分生孢子。

子。每个 2% W A (水琼脂) 平板加入 100 mL 分生孢子悬浮液, 并用玻棒涂抹均匀, 于 25℃ 下黑暗培养 12 h 后观察分生孢子的萌发情况。取萌发率的平均值计算抑制率(%), 通过浓度对数值(X)和抑制率机率值(Y)之间的线性回归关系求出毒力回归方程和 EC_{50} 值。

$$\text{分生孢子萌发抑制率}(\%) = \frac{\text{CK 的分生孢子萌发率} - \text{处理的分生孢子萌发率}}{\text{CK 的分生孢子萌发率}} \times 100$$

1.4 紫外线诱导番茄叶霉病菌获得抗异菌脲突变体

先通过预备实验确定紫外线照射的亚致死时间: 将每 mL 含 1×10^7 个分生孢子的 CF-23 菌株的分生孢子悬浮液涂布于 PDA 平板上, 每皿 0.2 mL, 25℃ 培养 2 h 至分生孢子萌动期后, 置于已预热 0.5 h 的紫外灯(40 W, 254 nm)下分别照射 0.1Q 2Q 3Q 5Q 6Q 9Q 120 和 180 s 照射距离为 20 cm, 照射后迅速放入 25℃ 黑暗条件下培养, 24 h 后观察比较孢子的萌发情况, 最后选择导致孢子萌发抑制率为 95% 的照射时间为亚致死诱变时间。本实验条件下为 30 s。CF-23 菌株的 MIC (最小抑制浓度) 确定方法如下: 将每 mL 含 1×10^7 个分生孢子的 CF-23 菌株的分生孢子悬浮液分别涂布在含 1、3、5、8、10、20 mg/mL 异菌脲的 PDA 平板上, 25℃ 下培养 3 d 后不能形成菌落的最低浓度即为 MIC。本实验条件下为 8 mg/mL。诱导抗性突变体实验是将每 mL 含 1.0×10^7 个分生孢子的 CF-23 菌株的分生孢子悬浮液涂布在含 20 μg/mL 异菌脲(能完全抑制 CF-23 菌落的形成)的 PDA 平板上, 如上紫外照射 30 s 后迅速放入 25℃ 黑暗条件下培养, 3~5 d 后观察, 菌落能扩展的经随机挑选、单孢分离和抗性验证后即为抗异菌脲突变体。

1.5 抗异菌脲突变体的抗性水平及其对药剂的敏感性测定

采用菌丝生长抑制率法测定突变体对异菌脲的敏感性, 以确定抗性水平, 用同样的方法测定其对腐霉利、乙烯菌核利的敏感性, 分析异菌脲与腐霉利、乙烯菌核利之间的交互抗性关系; 采用与

1.3 节中同样的方法测定其对其他药剂的敏感性。本实验中每处理重复 3 次(生长测定)或 4 次(萌发测定), 整个实验重复 2 次。

1.6 抗异菌脲突变体的生物学性状研究

1.6.1 菌丝生长、分生孢子产生及萌发能力 各突变体及其亲本菌株先在 PDA 平板上培养 5 d 活化, 然后在同一圆周上制取菌饼(直径 0.5 cm)接种到 PDA 平板中央, 每个菌株重复 4 次。25℃ 下黑暗培养 4 d 后, 测量各菌落直径(cm), 取平均值代表生长能力; 培养 7 d 后, 用无菌水洗下分生孢子, 用血球计数板计数, 取平均值代表产孢能力; 获得的各菌株的分生孢子悬浮液浓度都调节至每 mL 含 1.0×10^5 个分生孢子, 测定各自的萌发能力, 每个菌株重复 4 次。

1.6.2 致病力测定 采用离体叶片法。各突变体及其亲本菌株的分生孢子悬浮液浓度均调节至每 mL 含 1×10^6 个分生孢子, 每张番茄叶片中央接种 50 mL 分生孢子悬浮液, 接种后于 80% RH、12 h 光周期和 25℃ 条件下培养。接种后 7 d 调查发病情况。每个菌株用 20 张叶片, 用平均的病斑直径代表致病力。

1.6.3 对渗透胁迫的敏感性测定 参考马忠华等的方法^[6]。各突变体及其亲本菌株先在 PDA 平板上培养 5 d 活化, 然后在同一圆周上制取菌饼(直径 0.5 cm)分别转移到含 0、2Q、4Q、6Q 和 80 mg/mL 氯化钠的 PDA 平板中央, 每个菌株重复 4 次。25℃ 下黑暗培养 4 d 后, 测量各菌落直径(cm), 取平均值计算对菌丝生长的抑制率(%), 以此表示对渗透胁迫的敏感性。

$$\text{菌丝生长的抑制率}(\%) = \frac{\text{无氯化钠处理的菌落直径} - \text{氯化钠处理的菌落直径}}{\text{无氯化钠处理的菌落直径} - 0.5} \times 100$$

2 结果与分析

2.1 番茄叶霉病菌群体对不同类型药剂的敏感性

本实验中药剂处理浓度与抑制率间表现出很好的相关性。番茄叶霉病菌对各供试药剂的敏感性与其对苯并咪唑类杀菌剂和乙霉威的敏感性无关。根据对 CF-23($\text{Ben}^{\text{S}}\text{-D ie}^{\text{R}}$)、CF-18($\text{Ben}^{\text{R}}\text{-D ie}^{\text{S}}$)和 CF-12($\text{Ben}^{\text{R}}\text{-D ie}^{\text{R}}$) 3 种类型菌株 EC_{50} 的平均值, 16 种杀菌剂抑制番茄叶霉病菌菌丝生长的活性强弱依次为腐霉利 > 乙烯菌核利 > 异菌脲 > 戊唑醇 > 百菌清 > 啉霉胺 > 醚菌酯 > 代森锰锌 > 8-羟基喹啉铜 > 丙环唑 > 苯醚甲环唑 > 啉菌酯 > 灭锈胺 > 烯酰吗啉 > 烟酰胺 > 三唑酮; 抑制孢子萌发的活性依次为醚菌酯 > 腐霉利 > 百菌清 > 乙烯菌核利 > 灭锈胺 > 8-羟基喹啉铜 > 异菌脲 > 代森锰锌 > 啉菌酯 > 烟酰胺 > 啉霉胺 > 戊唑醇 > 丙环唑 > 苯醚甲环唑 > 三唑酮 > 烯酰吗啉。这说明二甲酰亚胺类杀菌剂对番茄叶霉病菌菌丝生长的活性最强, 对孢子萌发也表现出一定的活性(表 1)。

2.2 抗异菌脲突变体的获得及其抗性水平

本实验条件下, CF-23($\text{Ben}^{\text{S}}\text{-D ie}^{\text{R}}$) 菌株在紫外灯下照射 10、20 和 30 s 的孢子萌发抑制率分别为 53.3%、74.2% 和 93.5%, 照射 50 s 时抑制率即达 100%。以 CF-23($\text{Ben}^{\text{S}}\text{-D ie}^{\text{R}}$) 为亲本菌株, 通过紫外诱变共获得 17 株异菌脲抗性突变体, 突变频率为 4.5×10^{-7} 。低抗菌株(LR)、中抗菌株(MR)和高抗菌株(HR)分别占 17.65%、70.59% 和 11.75%, 抗性水平在 8.2~77.2 倍之间, 平均为 29.0 倍(表 2)。这些抗性突变体对腐霉利和乙烯菌核利也表现出抗性, 说明这 3 种二甲酰亚胺类药剂之间存在着交互抗性。其中对腐霉利的抗性水平在 8.3~79.8 倍之间, 平均为 29.1 倍; 对乙烯菌核利的抗性水平在 7.6~78.9 倍之间, 平均为 28.6 倍(表 2)。

2.3 抗异菌脲突变体对其他药剂的敏感性

通过紫外诱变获得的 17 株抗异菌脲突变体对醚菌酯、灭锈胺、烯酰吗啉、百菌清、戊唑醇、啉霉胺和 8-羟基喹啉铜 7 种药剂的敏感性与其亲本菌株之间均无显著性差异(表 3), 说明二甲酰亚胺类杀菌剂与供试其他类型的化合物之间不存在交互抗性关系。

2.4 抗异菌脲突变体的生物学性状

17 株抗异菌脲突变体在生长、产孢、孢子萌发能力等方面与亲本菌株 CF-23($\text{Ben}^{\text{S}}\text{-D ie}^{\text{R}}$) 均无显

著性差异(表 4), 说明番茄叶霉病菌对异菌脲的抗性突变对上述重要的生物学性状没有明显的影响。其中 15 株抗异菌脲突变体的致病力与亲本菌株没有显著性差异, 但是 YR-15 和 YR-28 两个突变体的致病力显著降低。笔者认为, 这两个菌株的致病力降低可能是紫外诱变过程中产生的负作用, 而不是由于对异菌脲产生抗性突变所致。因此, 番茄叶霉病菌对异菌脲抗性突变对其致病力也可能没有显著影响。

2.5 抗异菌脲突变体对渗透胁迫的敏感性

与生长、产孢、孢子萌发及致病能力等不同的是, 番茄叶霉病菌对异菌脲的抗性突变对其对渗透胁迫的敏感性有显著影响(表 5), 20、40、60 和 80 mg/mL 氯化钠对 17 株突变体生长的平均抑制率分别为 48.8%、50.5%、55.5% 和 65.8%, 而对亲本的抑制率则仅分别为 35.2%、39.5%、44.8% 和 49.9%。其中 YR-15 和 YR-25 两株高水平抗性菌株对渗透胁迫的敏感性尤其明显, 20、40、60 和 80 mg/mL 氯化钠对它们的平均抑制率分别为 57.9%、61.4%、68.0% 和 78.7%。

3 讨论

番茄叶霉病菌对苯并咪唑类杀菌剂已产生了十分严重的抗性^[2,3]。前期研究表明, 浙江、江苏地区番茄叶霉病菌对这类药剂的抗性频率高达 71.9%^[3]。但目前我国登记用于防治番茄叶霉病的只有以甲基硫菌灵为代表的苯并咪唑类杀菌剂。本研究针对该病害抗药性治理研究基本为空白, 进行了可用于替代苯并咪唑类杀菌剂的化合物的室内筛选, 发现二甲酰亚胺类杀菌剂对番茄叶霉病菌具有较高的活性, 尤其是抑制菌丝生长的活性为供试化合物中最高。不同的甾醇脱甲基抑制剂(DMIs)类化合物对叶霉病菌的活性差异较大, 本研究中戊唑醇、丙环唑、苯醚甲环唑、三唑酮抑制番茄叶霉病菌菌丝生长的 EC_{50} 值分别为 1.86、8.57、11.6 和 27.78 mg/mL。祁之秋等也曾报道氟硅唑对番茄叶霉病菌菌丝生长有较高的抑制活性^[17]。其中巴斯夫公司开发的新杀菌剂烟酰胺^[8,9]的活性也不高。但是部分药剂防治番茄叶霉病的实际效果还有待在田间进一步验证。另外, 叶霉病菌对上述各类药剂与苯并咪唑类杀菌剂和乙霉威之间无交互抗性, 这是由药剂间不同的作用机制导致的^[13-10]。笔者前期的研究

表 1 不同类型杀菌剂对番茄叶霉病菌的抑制活性

Table 1 Inhibitory activity of different kinds of fungicides against *Cladosporium fulvum*

杀菌剂 Fungicide	菌株 Isolates	EC ₅₀ /(mg /mL)		平均 EC ₅₀ 值 Mean EC ₅₀ value /(mg /mL)	
		菌丝生长 Mycelial growth	分生孢子萌发 Conidial germination	菌丝生长 Mycelial growth	分生孢子萌发 Conidial germination
腐霉利	CF-23	0.99	4.68		
procydione	CF-18	0.20	1.36	0.60	2.99
	CF-12	0.61	2.93		
	CF-23	1.05	6.05		
乙烯菌核利	CF-23	1.05	6.05		
vinclozolin	CF-18	0.71	5.55	0.81	5.47
	CF-12	0.66	4.82		
	CF-23	1.00	5.23		
异菌脉	CF-23	1.00	5.23		
iprodione	CF-18	1.12	6.73	1.10	6.29
	CF-12	1.17	6.91		
	CF-23	1.75	18.77		
戊唑醇	CF-23	1.75	18.77		
tebuconazole	CF-18	1.49	16.35	1.86	18.37
	CF-12	2.34	19.99		
	CF-23	4.02	3.96		
百菌清	CF-23	4.02	3.96		
chlorothalonil	CF-18	5.04	6.12	4.87	5.25
	CF-12	5.55	5.67		
	CF-23	5.29	15.23		
嘧霉胺	CF-23	5.29	15.23		
pyrimethanil	CF-18	4.63	13.16	5.19	15.14
	CF-12	5.65	17.02		
	CF-23	7.33	3.17		
醚菌酯	CF-23	7.33	3.17		
kresoxim-methyl	CF-18	6.53	2.97	6.57	2.79
	CF-12	5.85	2.24		
	CF-23	3.85	4.12		
代森锰锌	CF-23	3.85	4.12		
mancozeb	CF-18	10.44	9.89	6.61	6.66
	CF-12	5.55	5.97		
	CF-23	7.19	5.38		
8-羟基喹啉铜	CF-23	7.19	5.38		
8-hydroxyquinoline copper(II) salt	CF-18	8.77	5.90	8.34	6.17
	CF-12	9.06	7.24		
	CF-23	9.85	20.07		
丙环唑	CF-23	9.85	20.07		
propiconazole	CF-18	7.88	18.35	8.57	19.36
	CF-12	7.97	19.65		
	CF-23	12.12	35.67		
苯醚甲环唑	CF-23	12.12	35.67		
difenoconazole	CF-18	8.78	26.12	11.6	33.67
	CF-12	13.90	39.22		
	CF-23	13.18	7.74		
嘧菌酯	CF-23	13.18	7.74		
azoxystrobin	CF-18	15.27	8.52	14.31	8.38
	CF-12	14.48	8.87		
	CF-23	13.06	4.55		
灭锈胺	CF-23	13.06	4.55		
mepanil	CF-18	17.33	5.95	16.78	5.55
	CF-12	19.96	6.15		
	CF-23	7.05	25.30		
烯酰吗啉	CF-23	7.05	25.30		
dinethiomorph	CF-18	35.63	97.04	21.36	63.14
	CF-12	21.40	67.07		
	CF-23	19.34	8.39		
烟酰胺	CF-23	19.34	8.39		
boscalid	CF-18	20.18	8.39	22.07	9.18
	CF-12	26.70	10.75		
	CF-23	30.53	60.17		
三唑酮	CF-23	30.53	60.17		
triadimefon	CF-18	30.53	61.12	27.78	53.52
	CF-12	22.25	39.27		
	CF-23	22.25	39.27		

表 2 番茄叶霉病菌抗异菌脉突变体的抗性水平与交互抗药性

Table 2 Resistance level and cross-resistance of iprodione-resistant mutants of *C. fulvum*

菌株 Isolates	表型 Phenotype	异菌脉 iprodione		腐霉利 procymidone		乙烯菌核利 vinclozolin	
		EC ₅₀	抗性水平	EC ₅₀	抗性水平	EC ₅₀	抗性水平
		/(mg/mL)	Resistance factor**	/(mg/mL)	Resistance factor	/(mg/mL)	Resistance factor
CF-23	S*	1.00	—	0.99	—	1.05	—
YR-7	LR	8.67	8.7	8.54	8.6	8.93	8.5
YR-20	MR	30.06	30.1	29.87	30.2	31.23	29.7
YR-29	MR	22.49	22.5	21.54	21.8	21.08	20.1
YR-5	LR	9.43	9.4	9.65	9.7	9.89	9.4
YR-04	MR	18.57	18.6	18.76	18.9	26.14	24.9
YR-15	HR	74.90	74.9	75.12	75.9	78.13	78.9
YR-05	LR	8.16	8.2	8.24	8.3	7.99	7.6
YR-1	MR	36.91	36.9	36.98	37.4	38.18	36.4
YR-28	MR	34.88	34.9	33.78	34.1	33.29	31.7
YR-24	MR	17.96	18.0	16.90	17.1	19.09	18.2
YR-25	HR	77.17	77.2	78.98	79.8	80.96	77.1
YR-23	MR	19.66	19.7	19.13	19.3	21.19	20.2
YR-30	MR	13.30	13.3	14.23	14.4	13.02	12.4
YR-22	MR	38.40	38.4	40.13	40.5	37.34	35.6
YR-17	MR	28.47	28.5	27.06	27.3	27.90	26.6
YR-11	MR	36.63	36.5	34.09	34.3	33.16	31.6
YR-9	MR	16.35	16.4	16.18	16.3	18.96	18.1

注: * S、LR、MR 和 HR 分别表示异菌脉敏感、抵抗、中抗和高抗,下同。 ** 抗性水平 (Resistance factor) = 抗性突变体的 EC₅₀ 值 / 亲本的 EC₅₀ 值。

Note: * S、LR、MR 和 HR mean sensitive, lowly resistant, moderately resistant and highly resistant to iprodione. The following is the same.
** Resistance factor = EC₅₀ value of this resistant mutant / EC₅₀ value of its parent.

表 3 番茄叶霉病菌抗异菌脉突变体对其他类型药剂的敏感性

Table 3 Sensitivity of iprodione-resistant mutants of *C. fulvum* to other kinds of fungicides

菌株 Isolates	EC ₅₀ /(mg/mL)						
	醚菌酯 kresoxim-methyl	灭锈胺 mepanil	烯酰吗啉 dimethamorph	百菌清 chlorothalonil	戊唑醇 tebuconazole	嘧霉胺 pyrimethanil	8-羟基喹啉铜 8-hydroxyquinoline copper(II)
CF-23	3.17 a	4.55 a	7.05 a	4.02 a	1.75 a	5.29 a	5.38 a*
YR-7	3.02 a	4.55 a	7.26 a	4.36 a	1.60 a	5.11 a	5.09 a
YR-20	3.19 a	4.34 a	7.01 a	3.98 a	1.54 a	5.23 a	5.89 a
YR-29	3.26 a	4.45 a	6.89 a	3.99 a	1.99 a	5.09 a	5.43 a
YR-5	3.21 a	4.59 a	6.78 a	3.89 a	1.91 a	5.00 a	5.24 a
YR-04	3.17 a	4.63 a	7.23 a	3.87 a	1.76 a	5.78 a	5.17 a
YR-15	3.00 a	4.42 a	7.10 a	4.32 a	1.75 a	5.20 a	5.98 a
YR-05	2.98 a	4.47 a	7.03 a	4.23 a	1.87 a	5.22 a	4.98 a
YR-1	3.21 a	4.76 a	7.32 a	4.00 a	1.59 a	5.54 a	4.82 a
YR-28	3.35 a	4.34 a	6.78 a	4.18 a	1.53 a	5.13 a	5.09 a
YR-24	3.17 a	4.19 a	6.66 a	3.88 a	1.77 a	5.11 a	5.44 a
YR-25	3.11 a	4.68 a	6.98 a	4.32 a	1.98 a	5.00 a	5.77 a
YR-23	3.11 a	4.53 a	7.23 a	4.13 a	1.85 a	5.47 a	5.89 a
YR-30	3.24 a	4.54 a	7.00 a	3.78 a	1.80 a	5.34 a	4.97 a
YR-22	3.09 a	4.78 a	7.11 a	3.98 a	1.70 a	5.21 a	5.23 a
YR-17	3.17 a	4.33 a	7.07 a	4.12 a	1.68 a	5.19 a	5.35 a
YR-11	3.16 a	4.29 a	6.99 a	4.19 a	1.77 a	5.67 a	4.98 a
YR-9	3.22 a	4.58 a	6.69 a	3.91 a	1.75 a	5.66 a	5.28 a

注: * 同一列数据后相同的小写字母表示根据在 DPS 软件上进行 LSD 分析其在 P = 0.05 水平上差异不显著,下同。
Note: * Values with the same letters in the same row are not significantly different at P = 0.05 level according to a least significant difference test in software DPS. The following is the same.

表 4 番茄叶霉病菌抗异菌脲突变体的菌丝生长、产孢、孢子萌发和致病能力

Table 4 Mycelial growth, sporulation, conidial germination and pathogenicity of iprodione-resistant mutants of *C. fulvum*

菌株 Isolates	表型 Phenotype	菌丝生长 Mycelial growth/cm	产孢 Sporulation/($\times 10^6$)	分生孢子萌发 Conidial germination (%)	致病性 Pathogenicity/cm
CF-23	S	6.0 a	5.9 a	95.3 a	4.5 a
YR-7	LR	6.3 a	5.1 a	94.2 a	4.5 a
YR-20	MR	6.2 a	6.2 a	97.2 a	4.7 a
YR-29	MR	6.5 a	5.7 a	93.2 a	4.6 a
YR-5	LR	6.0 a	6.6 a	99.8 a	4.3 a
YR-04	MR	6.0 a	5.1 a	98.1 a	4.4 a
YR-15	HR	6.0 a	5.5 a	92.3 a	2.7 b
YR-05	LR	6.0 a	5.2 a	95.1 a	4.5 a
YR-1	MR	5.7 a	6.7 a	95.0 a	4.5 a
YR-28	MR	5.6 a	6.2 a	96.3 a	1.4 b
YR-24	MR	5.6 a	5.5 a	97.1 a	4.5 a
YR-25	HR	6.0 a	5.6 a	93.2 a	4.6 a
YR-23	MR	6.0 a	6.6 a	95.0 a	4.8 a
YR-30	MR	6.0 a	6.9 a	98.9 a	4.3 a
YR-22	MR	5.8 a	5.4 a	99.0 a	4.5 a
YR-17	MR	5.9 a	5.8 a	94.8 a	4.5 a
YR-11	MR	6.5 a	5.8 a	94.2 a	4.2 a
YR-9	MR	6.1 a	6.0 a	95.2 a	4.8 a

表 5 番茄叶霉病菌抗异菌脲突变体对渗透胁迫的敏感性

Table 5 Sensitivity of iprodione-resistant mutants of *C. fulvum* to osmotic stress

菌株 Isolates	表型 Phenotype	不同浓度氯化钠对菌丝生长的抑制率 (%) Inhibition rate (%) of mycelial growth by NaCl at the different concentration			
		Inhibition rate (%) of mycelial growth by NaCl at the different concentration			
		20 mg/mL	40 mg/mL	60 mg/mL	80 mg/mL
CF-23	S	35.2 a	39.5 a	44.8 a	49.9 a
YR-7	LR	40.2 b	43.2 b	47.2 b	53.8 b
YR-20	MR	48.6 c	49.5 c	53.3 c	64.2 c
YR-29	MR	49.6 c	50.3 c	55.2 c	65.6 c
YR-5	LR	41.2 b	43.4 b	47.8 b	53.9 b
YR-04	MR	48.6 c	50.0 c	54.7 c	63.9 c
YR-15	HR	56.9 d	60.8 d	67.9 d	78.3 d
YR-05	LR	41.6 b	44.1 b	48.3 b	54.7 b
YR-1	MR	48.8 c	50.8 c	55.9 c	67.4 c
YR-28	MR	49.6 c	50.0 c	56.0 c	66.8 c
YR-24	MR	49.0 c	50.1 c	56.0 c	68.3 c
YR-25	HR	58.9 d	61.9 d	68.1 d	79.0 d
YR-23	MR	50.0 c	51.0 c	56.8 c	69.3 c
YR-30	MR	48.8 c	49.9 c	53.2 c	64.0 c
YR-22	MR	50.2 c	51.4 c	56.2 c	67.0 c
YR-17	MR	49.4 c	51.3 c	56.1 c	68.3 c
YR-11	MR	49.0 c	50.7 c	55.7 c	66.7 c
YR-9	MR	49.4 c	50.6 c	55.3 c	67.2 c

表明,浙江、江苏地区设施番茄上的叶霉病菌对二甲酰亚胺类杀菌剂还未出现抗性^[3],本研究进一步诱导和描述了叶霉病菌的异菌脉抗性突变体。通过紫外诱变共获得 17 株抗异菌脉突变体,突变频率为 4.5×10^{-7} 。这些突变体与亲本菌株在生长、产孢、致病能力等方面均无显著性差异,但对渗透胁迫的敏感性显著高于亲本。这一结果与灰霉病菌的情况类似:在实验室条件下很容易获得灰霉病菌对二甲酰亚胺类杀菌剂的高抗菌株,但这些高抗菌株对渗透压敏感性高而适合度低^[11,12]。笔者前期的研究也表明只有频率为 20% 左右的低水平抗性产生^[13]。这可能就是二甲酰亚胺类杀菌剂在灰霉病防治上已经应用了近 20 年仍然未产生较高抗性的原因。在对开心果上由 *Alternaria* spp 引起的晚疫病 (*Alternaria late blight*) 的研究中也获得了类似的结果^[6]。因此,笔者认为异菌脉在叶霉病防治上存在一定的应用潜力,但还需要进一步的研究确证。另外,由于叶霉病菌对这类药剂比较容易发生抗性突变,因此应制定合理的施药方案,避免其在同一生长季连续单一使用,并应与其他作用方式不同的杀菌剂轮换使用或混用,以延缓抗性的产生。

参考文献:

- [1] CHEN Li-feng(陈利锋), XU Jing-you(徐敬友). Agricultural Plant Pathology, South Edition(农业植物病理学,南方本) [M]. Beijing(北京): China Agriculture Press(中国农业出版社). 2001: 315-317
- [2] WANG Mei-qin(王美琴), LIU Hui-ping(刘慧平), HAN Ju-cai(韩巨才), et al. 番茄叶霉病菌对多菌灵、乙霉威及代森锰锌的抗性检测 [J]. Chin J Pestic Sci (农药学报), 2003, 5 (4): 30-36
- [3] YAN L Y, CHEN J, ZHANG C Q, et al. Molecular Characterization of Benzimidazole-resistant Isolates of *Cladosporium fulvum* [J]. FEMS Microbiol Lett, 2008, 278: 242-248
- [4] ELAD Y, SHABI E, KATAN T. Negative Cross-resistance between Benzimidazole and N-Phenylcarbamate Fungicides and Control of Botrytis cinerea on Grapes [J]. Plant Pathology, 1988, 37: 141-147
- [5] HILBER U W, HILBER B M. Genetic Basis and Monitoring of Resistance of Botryotinia fuckeliana to Anilinopyrimidines [J]. Plant Dis, 1998, 82: 496-500
- [6] MA Z H, Michailides T J. Characterization of Iprodione-resistant *Alternaria* Isolates from Pistachio in California [J]. Pestic Biochem Physiol, 2004, 80: 75-84
- [7] QIZHI-qiu(祈之秋), JIMING-shan(纪明山), ZHANG Chi(张弛), et al. 番茄叶霉病菌对氟硅唑敏感性基线与抗药性风险研究 [J]. Plant Protection (植物保护), 2004, 30: 53-55
- [8] ZHANG C Q, YUAN S K, SUN H Y, et al. Sensitivity of Botrytis cinerea to Boscalid [J]. Plant Pathology, 2007, 56: 646-653
- [9] MATHERON M E, PORCHAS M. Activity of Boscalid, Fenhexamid, Fluazinam, Fudioxonil and Vinclozolin on Growth of Sclerotinia minor and S. sclerotiorum and Development of Lettuce Drop [J]. Plant Dis, 2004, 88: 665-668
- [10] GISIU, CHN M K, KNAPOVA G, et al. Recent Development in Elucidating Modes of Resistance to Phenylamide, DM I and Strobilurin Fungicides [J]. Crop Prot, 2000, 19: 863-872
- [11] ROSSLENBROICH H J, STUBLER D. Botrytis cinerea—History of Chemical Control and Novel Fungicides for its Management [J]. Crop Prot, 2000, 19: 557-561
- [12] PAPPAS A C. Evolution of Fungicide Resistance in Botrytis cinerea in Protected Crops in Greece [J]. Crop Prot, 1997, 16 (3): 257-263
- [13] ZHANG Chuan-qing(张传清), ZHANG Ya(张雅), WEI Fang-lin(魏方林), et al. 设施蔬菜灰霉病菌 Botryotinia fuckeliana 对不同类型杀菌剂的抗性检测 [J]. Chin J Pestic Sci (农药学报), 2006, 8(3): 245-249

(Ed JIN SH)