

番茄早疫病菌抗啮酰菌胺菌株的适合度及生物学特性

史晓晶¹ 任璐² 陈浩¹ 韩巨才^{2*}

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

摘要: 为了评价番茄早疫病菌 *Alternaria solani* 对啮酰菌胺的抗性风险, 采用菌丝直径法和孢子萌发法探讨番茄早疫病菌抗啮酰菌胺菌株的适合度变化和生物学性状差异。结果表明: 番茄早疫病菌对啮酰菌胺的抗性可稳定遗传; 与敏感菌株相比, 抗性菌株的菌丝生长减慢, 产孢量明显增多, 病斑直径达 8.5 mm 以上, 致病力显著增强, 产毒量也有增加的趋势, 但孢子萌发率无显著差异; 啮酰菌胺对抗性菌株的防效显著下降为 64.17% ~ 33.49%; 抗性菌株的最适 pH 范围变宽为 5 ~ 9; 中抗菌株的最适温度 (25℃)、最佳碳源 (淀粉和乳糖) 和氮源 (蛋白胨) 没发生变化, 但高抗和极高抗菌株的最适温度范围变宽为 25 ~ 30℃, 最适碳、氮源发生了变化。其中, 高抗菌株的最适碳、氮源分别为乳糖和大豆粉; 极高抗菌株的最适碳源为淀粉, 最适氮源为玉米粉和蛋白胨。表明番茄早疫病菌对啮酰菌胺产生抗性后, 较易存活而形成优势群体, 因此需采取一定措施延缓抗性的发展、延长啮酰菌胺的使用期限。

关键词: 番茄早疫病菌; 啮酰菌胺; 适合度; 生物学特性

Fitness and biological characteristics of *Alternaria solani* with boscalid resistance

Shi Xiaojing¹ Ren Lu² Chen Hao¹ Han Jucui^{2*}

(1. Department of Biology, Xinzhou Normal University, Xinzhou 034000, Shanxi Province, China;

2. College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi Province, China)

Abstract: To assess the resistance risk of *Alternaria solani* to boscalid, the fitness and biological characteristics of boscalid-resistant strains were tested by measuring colony diameter or spore germination. The results showed that the boscalid-resistance of *A. solani* could be inherited steadily. The mycelial growth of resistant strains declined, but the sporulation increased significantly. The diameters of disease lesion of resistant strains were more than 8.5 mm and their pathogenicity also increased obviously. The toxin production of resistant strains tended to increase, but their spore germinations did not vary apparently. The control efficacy (64.17% – 33.49%) of boscalid to resistant strains went down significantly. The range of optimum pH (5 – 9) for resistant strains became wider. The optimum growth temperature (25℃), the optimum carbon source (starch and lactose) and the optimum nitrogen source (peptone) of moderately resistant strains did not change, but the range of optimum growth temperature (25 – 30℃) of highly and very highly resistant strains became wider, and the optimum nutrient of them changed. The optimum carbon and nitrogen sources of highly resistant strains were lactose and soybean flour, respectively. The optimum carbon source of very highly resistant strains was starch, and the

基金项目: 山西省科技基础条件平台建设项目(2014091003-0102), 山西省农业技术推广示范行动项目(SNJTGsfXD201402), 忻州师范学院 2013 年院级青年基金项目(QN201320)

* 通讯作者 (Author for correspondence), E-mail: sxndhjc@163.com

收稿日期: 2015-08-14

optimum nitrogen sources were peptone and corn flour. Therefore, the boscalid-resistant strains could survive well in the nature and become the dominant population easily. Thus, more control strategies should be considered to postpone the development of resistance and prolong the use of boscalid.

Key words: *Alternaria solani*; boscalid; fitness; biological characteristics

番茄早疫病 (tomato early blight, tEB) 是番茄生产上最严重的叶部病害之一 (郝变青等, 2013), 其病原为番茄早疫病菌 *Alternaria solani* (Ellis & Martin) Sorauer。通常采用轮作 (3~5 年)、使用无病原移植苗和施用杀菌剂来防治 tEB (董金皋, 2001)。然而当环境中存在侵染源, 且环境条件利于病害发生和发展时, 杀菌剂是最有效的病害控制方式 (Cherani & Voorrips, 2006)。在 tEB 防治中, 啮酰菌胺 (boscalid) 是非常有效的杀菌剂 (Pasche et al., 2005; Pasche & Gudmestad, 2008)。啮酰菌胺属于琥珀酸脱氢酶抑制剂类杀菌剂, 通过抑制琥珀酸脱氢酶的活性而阻碍线粒体呼吸 (FRAC, 2009)。在澳大利亚, 啮酰菌胺已经被加入了 tEB 防治用药策略 (Horsfield et al., 2010); 在美国, 啮酰菌胺已成为甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂的替代品, 且使用频率超过任何一种叶用杀菌剂 (Gudmestad et al., 2013)。

尽管病原菌对啮酰菌胺的抗性发展存在中度风险 (FRAC, 2009), 但该药剂的频繁使用必会导致抗药性的产生与发展。近几年, 已有许多病原菌对啮酰菌胺产生了抗性。Yin et al. (2011) 发现 19.1% 灰葡萄孢菌 *Botrytis cinerea* 对啮酰菌胺存在抗性; Leroch et al. (2011) 连续监测了德国葡萄酒之路沿线灰葡萄孢菌对啮酰菌胺的敏感性, 发现从 2006 年至 2009 年抗性频率由 2% 上升为 26.7%; Miyamoto et al. (2009; 2010) 检测到日本茨城县保护地中有 48.9% 黄瓜褐斑病菌 *Corynespora cassicola* 和 45.9% 黄瓜白粉病菌 *Podosphaera xanthii* 对啮酰菌胺表现出抗性, 最小抑制浓度分别高于 30 $\mu\text{g/mL}$ 和 50 $\mu\text{g/mL}$ 。另外, 开心果晚疫病菌 *Alternaria alternata* 对啮酰菌胺已产生抗性, 但比例较低 (Avenot et al., 2008); 桃褐腐病菌 *Monilinia fructicola* 对啮酰菌胺的敏感性在 3 年间也降低了 5 倍 (Amiri et al., 2010); 马铃薯早疫病菌 *A. solani* 对啮酰菌胺的抗性频率为 16% (Miles et al., 2013); 瓜类蔓枯病菌 *Didymella bryoniae* 中甚至有 86.4% 对啮酰菌胺呈高抗以上水平 (Avenot et al., 2012)。在我国山西省, 啮酰菌胺的使用在 2010 年前并不普遍 (任璐等, 2014), 但在此后使用频率逐年攀升, 同时也出现了抗性问題。其中, 番茄早疫病菌对啮酰菌胺的抗性

频率达 54.0% (Shi et al., 2015)。目前, 针对番茄早疫病菌对啮酰菌胺的抗性研究主要集中于检测和 *Sdh* 基因方面 (Mallik et al., 2014; Shi et al., 2015), 而对于适合度和生物学特性的研究甚少。因此, 本研究以抗、感啮酰菌胺菌株为试验材料, 探讨番茄早疫病菌对啮酰菌胺产生抗性后适合度的变化和生物学性状的差异, 以此评价抗啮酰菌胺菌株是否有发展为优势菌群的潜力, 旨在为该杀菌剂的科学使用和抗性治理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株: 2012—2013 年, 从山西省晋中、运城、长治、忻州和大同 5 个地区的田间或大棚中采集 tEB 病叶或病果, 单孢分离番茄早疫病菌, 4℃ 下低温保存于忻州师范学院微生物实验室。根据 Mallik et al. (2014) 的方法将番茄早疫病菌对啮酰菌胺的抗性水平划分为: $\text{EC}_{50} < 5 \mu\text{g/mL}$ 的菌株为敏感菌株 (S 菌株), EC_{50} 在 5~20 $\mu\text{g/mL}$ 之间的菌株为中抗菌株 (RM 菌株), EC_{50} 在 20~100 $\mu\text{g/mL}$ 之间的菌株为高抗菌株 (RH 菌株), $\text{EC}_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ 的菌株为极高抗菌株 (RVH 菌株)。根据此标准, 随机选取 S 菌株 J93 和 J51、RM 菌株 J9 和 J12、RH 菌株 J11 和 J7、RVH 菌株 X8 和 X14, 这些菌株的 EC_{50} 值依次为 0.31、1.00、5.46、13.66、27.29、99.72、161.42 和 164.20 $\mu\text{g/mL}$ 。抗性菌株包括 RM、RH 和 RVH 菌株。

供试药剂和培养基: 96.2% 啮酰菌胺 (boscalid) 原药, 扬州昱峰化工有限公司, 用丙酮配制成 10 000 $\mu\text{g/mL}$ 母液, 4℃ 下保存, 备用; 使用时, 用无菌水稀释。马铃薯葡萄糖培养液 (potato dextrose, PD): 马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g, 加水定容至 1 000 mL; 马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (potato dextrose agar, PDA): PD 配方中添加 20 g/L 琼脂; 理查培养基: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.5 g、 FeCl_3 0.02 g、 KNO_3 10 g、 KH_2PO_4 5 g、蔗糖 50 g、琼脂 20 g, 加水定容至 1 000 mL。试验中所用化学试剂均为分析纯。

仪器: SPX 型智能生化培养箱, 宁波江南仪器厂; DHG-9140 型电热恒温鼓风干燥箱, 上海精宏实

验设备有限公司;XSZ-G 光学显微镜,重庆光学仪器厂;TS-211C 卧式恒温振荡器,上海天呈实验仪器制造有限公司;游标卡尺(精度 0.05 mm),哈尔滨量具刃具集团有限责任公司。

1.2 方法

1.2.1 适合度测定

抗性菌株遗传稳定性测定:用无菌水稀释脲酰菌胺母液并混入 PDA 中,分别制备成浓度为 0.1、0.5、1、5 或 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 脲酰菌胺的含药培养基。将抗性菌株在 PDA 平板上,25℃ 连续转代培养 20 代,每代培养 4 d。然后制备第 1、5、10、15 和 20 代菌株直径 5 mm 的菌碟,将菌碟上有菌丝的一面向下接种在不同药剂浓度的含药平板中心,以含相同体积无菌水的 PDA 为对照,每皿 1 块,每个菌株重复 3 次。25℃ 下培养 5 d 后,采用十字交叉法测量菌落直径,计算脲酰菌胺各浓度对菌丝生长的抑制率。根据药剂浓度 $\log_{10}$ 值与菌丝生长抑制率之间的关系,求出 EC_{50} 值。试验重复 3 次。菌丝生长抑制率 = $[1 - (\text{药剂处理菌落直径} - \text{菌碟直径}) / (\text{对照菌落直径} - \text{菌碟直径})] \times 100\%$ 。

生长速率、产孢量及孢子萌发率测定:将 5 mm 抗、感菌株的菌碟接种在 PDA 平板上,25℃ 培养 4 d,测量菌落直径,计算生长速率。25℃ 下继续培养,待供试菌株菌丝长满全皿后,将菌丝与培养基一同置于 250 mL 三角瓶,并加入 20 mL 无菌水,充分震荡以洗下孢子,4 层纱布过滤,采用血球计数法测定孢子浓度,比较产孢差异。将孢子悬浮液稀释至 10^5 个/mL,取 100 μL 滴在凹玻片中央,25℃ 保湿培养 8 h,镜检孢子萌发情况,计算孢子萌发率。试验重复 3 次。孢子萌发率 = 分生孢子萌发数/镜检总数 $\times 100\%$ 。

产毒量测定:将 5 mm 抗、感菌株的菌碟接种到 250 mL PD 培养液中,25℃ 振荡培养 30 d,4 层纱布过滤,滤液在 3 000 g 下离心 15 min,取上清液,灭菌,即得粗毒素。用无菌水将粗毒素稀释成 1%、2%、5%、10%、20%、50% 和 100% 共 7 个浓度。将表面消毒过的番茄种子用各浓度粗毒素浸泡 24 h,以无菌水浸泡为对照,然后在 25℃ 下无菌保湿培养 4 d,测定种子萌发数,并计算种子萌发抑制率。根据毒素浓度 $\log_{10}$ 值与种子萌发抑制率之间的关系,求出萌发抑制中浓度 (EC_{50} 值),通过分析萌发抑制中浓度来比较菌株的产毒量。试验重复 3 次。种子萌发抑制率 = $(1 - \text{毒素处理种子萌发数} / \text{对照种子萌发数}) \times 100\%$ 。

致病力测定:取新鲜、健康的番茄叶片,制备成

直径 1.5 cm 的叶碟,进行表面消毒(无菌水冲洗、75% 乙醇中浸泡 2 min、无菌水冲洗 3 次,晾干)。用无菌针在叶碟中央穿刺,然后置于无菌培养皿中。此无菌培养皿底部含湿润的滤纸以保湿。分别将抗、感菌株直径 5 mm 菌碟接种在叶碟上被穿刺部位。25℃ 下无菌保湿培养 4 d 后,测量每个叶碟上的病斑(mm)大小以评价致病力。试验重复 3 次。

脲酰菌胺防效测定:选择 5~6 叶番茄植株幼苗为待试植株,将叶片喷施 5% (v/v) 次氯酸钠溶液表面消毒 1 min,无菌水漂洗 3 次,晾干。将 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 脲酰菌胺(商业推荐剂量)喷施于叶片上,喷施量以在叶片上刚好不形成液滴为宜(大约 50 μL),以无菌水为对照,晾干。用无菌针穿刺叶片,并将 3 mm 抗、感菌株的菌碟倒扣在穿刺部位,每片叶片接种 1 块菌碟。25℃ 下温育 7 d 后,测量病斑直径,计算防治效果。每处理重复 3 次,试验重复 2 次。防治效果 = $[1 - (\text{处理病斑直径} - \text{菌碟直径}) / (\text{对照病斑直径} - \text{菌碟直径})] \times 100\%$ 。

1.2.2 生物学特性测定

最适生长温度测定:将 5 mm 抗、感菌株的菌碟接种于 PDA 平板上,分别于 5、10、15、20、25、30℃ 下培养,96 h 后记录菌落直径,并计算生长速率,试验重复 3 次。

最适生长 pH 测定:将 PDA 培养基的 pH 值分别调至 4、5、6、7、8、9、10 和 11。取 5 mm 抗、感菌株的菌碟分别接种于不同 pH 值的 PDA 平板上,每个处理重复 3 次。25℃ 培养 96 h 后,测量菌落直径,计算菌丝生长速率。

最适碳、氮源测定:以理查培养基为基本培养基,选用葡萄糖、甘露醇、可溶性淀粉、丙三醇和乳糖为置换碳源;蛋白胨、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、玉米粉、大豆粉、尿素为置换氮源。置换碳、氮源时,应分别取等同于 50 g 蔗糖含糖量的量或 10 g KNO_3 含氮量的量,将 5 mm 抗、感菌株的菌碟接种于含不同碳、氮源的理查培养基上,25℃ 培养 96 h 后测量菌落直径,计算菌丝生长速率,试验重复 3 次。

1.3 数据分析

试验数据均采用 SPSS 16.0 软件进行处理,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 番茄早疫病菌抗性菌株的适合度

2.1.1 抗性菌株的遗传稳定性

在无药 PDA 平板上连续培养 20 代后,脲酰菌

胺对抗性菌株的 EC₅₀ 值变化不大(表 1)。表明番茄早疫病菌对啶酰菌胺产生抗性后,即便长期脱离该药剂,抗药性也不丧失,能稳定遗传,难以恢复到敏感水平。

表 1 番茄早疫病菌抗啶酰菌胺菌株的遗传稳定性

Table 1 Sensitivity of <i>Alternaria solani</i> resistant strains to boscalid in different generations						μg/mL
菌株 Strain	EC ₅₀ (95% CL)					
	第 1 代 1st generation	第 5 代 5th generation	第 10 代 10th generation	第 15 代 15th generation	第 20 代 20th generation	
J9 (RM)	5.46 (4.04 ~ 7.39)	6.10 (4.91 ~ 7.58)	6.46 (3.93 ~ 10.62)	5.65 (3.39 ~ 9.44)	5.83 (1.87 ~ 18.15)	
J12 (RM)	13.66 (8.44 ~ 22.11)	12.71 (3.49 ~ 46.24)	14.76 (6.57 ~ 33.16)	13.82 (5.72 ~ 33.42)	13.36 (7.00 ~ 25.47)	
J11 (RH)	27.29 (13.16 ~ 56.56)	27.53 (9.41 ~ 80.59)	27.25 (10.48 ~ 70.87)	29.14 (11.73 ~ 72.40)	28.67 (11.75 ~ 69.96)	
J7 (RH)	99.72 (11.41 ~ 871.34)	106.00 (26.67 ~ 421.34)	96.92 (25.94 ~ 362.09)	98.60 (42.73 ~ 227.54)	96.82 (27.79 ~ 337.33)	
X8 (RVH)	161.42 (40.73 ~ 661.88)	162.73 (76.87 ~ 344.47)	159.84 (47.54 ~ 537.41)	163.03 (58.40 ~ 455.11)	158.00 (71.64 ~ 348.45)	
X14 (RVH)	164.20 (51.70 ~ 504.01)	167.30 (60.00 ~ 466.48)	166.30 (67.43 ~ 410.10)	166.05 (53.88 ~ 511.71)	165.67 (79.40 ~ 345.65)	

RM: 中抗; RH: 高抗; RVH: 极高抗。RM: Moderate resistance; RH: high resistance; RVH: very high resistance.

2.1.2 抗、感菌株的生长速率、产孢量及孢子萌发率

随着菌株抗性的增强,菌丝生长速率有下降的趋势(表 2)。中抗菌株 J9 的生长速率低于敏感菌株,但差异不显著,而除 J9 菌株外的其它抗性菌株的生长速率显著低于敏感菌株($P < 0.05$)。总体而言,番茄早疫病菌对啶酰菌胺产生抗性后,其菌丝生

长能力有所下降。

与敏感菌株相比,抗性菌株的产孢量为 $(1.92 \sim 2.00) \times 10^6$ 个/mL,数量明显增多($P < 0.05$),但孢子萌发率没有显著变化(表 2)。表明抗性菌株的繁殖能力明显增强,但孢子的萌发率没有因为抗性的产生而发生改变。

表 2 番茄早疫病抗、感菌株的适合度指标及啶酰菌胺对抗、感菌株的防效

Table 2 Comparison of growth rate, sporulation, spore germination rate, pathogenicity and toxin production of resistant and sensitive strains of <i>Alternaria solani</i> to boscalid and the control efficacy of boscalid to these strains						
菌株 Strain	生长速率 (mm/h) Growth rate	产孢量 ($\times 10^6$ /mL) Sporulation	孢子萌发率 (%) Germination rate	毒素 EC ₅₀ (%) EC ₅₀ of toxin	致病力 (mm) Pathogenicity	啶酰菌胺防效 (%) Control efficacy of boscalid
J93 (S)	0.23 ± 0.02 a	0.93 ± 0.17 b	43.19 ± 4.24 a	40.11 ± 21.71 a	5.75 ± 0.35 c	94.12 ± 0.46 a
J51 (S)	0.23 ± 0.01 a					
J9 (RM)	0.19 ± 0.03 ab	1.96 ± 0.62 a	48.57 ± 4.57 a	2.95 ± 0.60 b	9.50 ± 0.71 b	64.17 ± 1.70 b
J12 (RM)	0.16 ± 0.03 b					
J11 (RH)	0.16 ± 0.03 b	1.92 ± 0.91 a	48.02 ± 10.72 a	13.36 ± 2.26 ab	8.50 ± 0.71 b	52.38 ± 0.46 c
J7 (RH)	0.15 ± 0.03 bc					
X14 (RVH)	0.14 ± 0.06 c	2.00 ± 0.73 a	56.84 ± 13.26 a	2.58 ± 0.03 b	11.25 ± 1.77 a	33.49 ± 1.18 d
X8 (RVH)	0.14 ± 0.06 c					

S: 敏感; RM: 中抗; RH: 高抗; RVH: 极高抗。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。S: Sensitive; RM: moderate resistance; RH: high resistance; RVH: very high resistance. 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.

2.1.3 抗、感菌株的产毒量和致病力

中抗、极高抗菌株的毒素 EC₅₀ 值为 2.95% 和

2.58%,产毒量显著高于敏感菌株(40.11%, $P < 0.05$);而高抗菌株则介于中间类型($P > 0.05$),但

其产毒量也有增强的趋势。同时,抗性菌株的病斑直径达 8.5 mm 以上,致病力显著增强($P < 0.05$,表 2)。

2.1.4 噻酰菌胺对抗、感菌株的防效

噻酰菌胺对敏感菌株的防效可达 94.12%,而对中、高抗菌株的防效则降至 64.17% 和 52.38%,对极高抗菌株的防效甚至只有 33.49% (表 2)。表明番茄早疫病菌对噻酰菌胺产生抗性后,该药剂的防效会显著下降,并且抗性越强,防效越低。

表 3 温度对番茄早疫病菌抗、感菌株生长速率的影响

Table 3 Effects of temperature on mycelium growth rates of resistant and sensitive strains of <i>Alternaria solani</i> to boscalid				
				mm/h
温度 (℃) Temperature	S 菌株 S strain	RM 菌株 RM strain	RH 菌株 RH strain	RVH 菌株 RVH strain
5	0.03 ± 0.01 e	0.03 ± 0.01 d	0.03 ± 0.01 e	0.02 ± 0.00 d
10	0.06 ± 0.01 d	0.05 ± 0.01 d	0.06 ± 0.01 d	0.04 ± 0.01 d
15	0.11 ± 0.01 c	0.10 ± 0.01 c	0.08 ± 0.01 c	0.08 ± 0.01 c
20	0.18 ± 0.04 b	0.16 ± 0.01 b	0.15 ± 0.01 b	0.15 ± 0.02 b
25	0.24 ± 0.01 a	0.20 ± 0.00 a	0.17 ± 0.02 a	0.20 ± 0.04 a
30	0.18 ± 0.04 b	0.17 ± 0.03 b	0.18 ± 0.02 a	0.19 ± 0.02 a

S: 敏感; RM: 中抗; RH: 高抗; RVH: 极高抗。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。S: Sensitive; RM: moderate resistance; RH: high resistance; RVH: very high resistance. 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.

2.2.2 抗、感菌株的最适生长 pH

虽然各番茄早疫病菌菌株在 pH 为 4 ~ 11 范围内都能生长,但在偏酸或偏碱的条件下,菌丝生长都受到一定的抑制(表 4)。敏感菌株的最适生长 pH

2.2 番茄早疫病菌抗性菌株的生物学特性

2.2.1 抗、感菌株的最适生长温度

在不同温度下,敏感和中抗菌株在 25℃ 时的生长速率最高($P < 0.05$),高抗和极高抗菌株在 25 ~ 30℃ 的生长速率显著高于其它温度($P < 0.05$,表 3)。表明敏感、中抗、高抗和极高抗菌株的最适生长温度分别为 25、25、25 ~ 30 和 25 ~ 30℃;随着番茄早疫病菌对噻酰菌胺抗性的提高,最适生长温度的范围有所扩大。

为 6 ~ 8,而抗性菌株的最适生长 pH 为 5 ~ 9($P < 0.05$,表 4)。表明番茄早疫病菌对噻酰菌胺产生抗性后,其最适生长 pH 有所改变,范围变宽。

表 4 pH 对番茄早疫病菌抗、感菌株生长速率的影响

Table 4 Effects of pH on mycelium growth rates of resistant and sensitive strains of <i>Alternaria solani</i> to boscalid				
				mm/h
pH	S 菌株 S strain	RM 菌株 RM strain	RH 菌株 RH strain	RVH 菌株 RVH strain
4	0.18 ± 0.04 c	0.20 ± 0.01 c	0.14 ± 0.01 e	0.21 ± 0.05 d
5	0.21 ± 0.00 b	0.23 ± 0.02 abc	0.18 ± 0.01 abcd	0.22 ± 0.03 abc
6	0.22 ± 0.01 ab	0.25 ± 0.02 a	0.19 ± 0.01 ab	0.23 ± 0.03 a
7	0.23 ± 0.03 a	0.24 ± 0.01 ab	0.20 ± 0.02 a	0.23 ± 0.01 ab
8	0.23 ± 0.02 a	0.23 ± 0.01 abc	0.18 ± 0.02 abc	0.22 ± 0.03 abc
9	0.19 ± 0.04 c	0.22 ± 0.01 abc	0.17 ± 0.02 bcd	0.21 ± 0.02 bcd
10	0.18 ± 0.03 c	0.22 ± 0.02 bc	0.16 ± 0.02 cde	0.21 ± 0.02 cd
11	0.18 ± 0.03 c	0.22 ± 0.03 bc	0.15 ± 0.01 de	0.21 ± 0.02 cd

S: 敏感; RM: 中抗; RH: 高抗; RVH: 极高抗。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。S: Sensitive; RM: moderate resistance; RH: high resistance; RVH: very high resistance. 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.

2.2.3 抗、感菌株的最适碳、氮源

番茄早疫病菌菌株在含不同碳、氮源的培养基上生长速率明显不同($P < 0.05$,表5)。敏感和中抗菌株的最适碳源为淀粉和乳糖,最适氮源为蛋白胨;高抗菌株的最适碳、氮源分别为乳糖和大豆粉;极高

抗菌株的最适碳源为淀粉,最适氮源为玉米粉和蛋白胨。中抗菌株的最适碳、氮源与敏感菌株一样,未发生变化,而高抗和极高抗菌株的最适碳、氮源则发生了变化。表明番茄早疫病菌对啮酰菌胺产生抗性后,对营养的要求有了一定程度的改变。

表 5 番茄早疫病菌抗、感菌株在不同碳、氮源上的菌丝生长速率

		mm/h			
碳、氮源		S 菌株	RM 菌株	RH 菌株	RVH 菌株
Carbon or nitrogen source		S strain	RM strain	RH strain	RVH strain
碳源 Carbon source	甘露醇 Mannitol	0.12 ± 0.02 b	0.10 ± 0.03 b	0.09 ± 0.01 b	0.11 ± 0.02 c
	葡萄糖 Glucose	0.13 ± 0.02 b	0.10 ± 0.04 b	0.07 ± 0.01 c	0.11 ± 0.02 bc
	乳糖 Lactose	0.15 ± 0.01 a	0.11 ± 0.03 ab	0.12 ± 0.04 a	0.12 ± 0.01 b
	蔗糖 Sucrose	0.13 ± 0.02 b	0.10 ± 0.03 b	0.09 ± 0.02 b	0.12 ± 0.01 bc
	丙三醇 Glycerol	0.10 ± 0.03 c	0.09 ± 0.04 b	0.06 ± 0.01 c	0.08 ± 0.01 d
	淀粉 Starch	0.17 ± 0.01 a	0.13 ± 0.04 a	0.11 ± 0.01 b	0.14 ± 0.02 a
氮源 Nitrogen source	蛋白胨 Peptone	0.21 ± 0.03 a	0.16 ± 0.02 a	0.12 ± 0.02 b	0.20 ± 0.04 a
	KNO ₃	0.13 ± 0.02 c	0.10 ± 0.03 b	0.09 ± 0.02 c	0.12 ± 0.01 c
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.09 ± 0.02 d	0.07 ± 0.04 c	0.05 ± 0.01 d	0.06 ± 0.01 d
	玉米粉 Corn flour	0.18 ± 0.03 b	0.11 ± 0.03 b	0.10 ± 0.02 c	0.21 ± 0.04 a
	大豆粉 Soybean flour	0.15 ± 0.06 bc	0.11 ± 0.01 b	0.13 ± 0.01 a	0.18 ± 0.02 b
	尿素 Urea	0.04 ± 0.02 e	0.03 ± 0.01 d	0.03 ± 0.01 e	0.02 ± 0.01 e

S: 敏感; RM: 中抗; RH: 高抗; RVH: 极高抗。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。S: Sensitive; RM: moderate resistance; RH: high resistance; RVH: very high resistance. 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.

3 讨论

病原菌对药剂产生抗性后,其抗药性性状能否稳定地传递给后代,决定着整个抗性群体的发展。本试验发现番茄早疫病菌对啮酰菌胺产生抗性后,其抗性能稳定遗传下来,这一结果与 Avenot & Michailides (2007) 对开心果晚疫病菌抗啮酰菌胺菌株遗传稳定性的报道相一致。这种现象表明番茄早疫病菌对啮酰菌胺抗性的产生出现了胞内选择的现象,纵使是在无药剂压力的选择下依旧稳定,并且这种遗传突变以内在因素的方式成为了抗性群体向优势群体发展的决定因素。

抗性菌株的适合度是评价抗性风险的非常重要的参数(Ziogas et al., 2005)。抗性产生后,会使适合度发生变化而影响病原菌群体在田间的反应。因此,根据适合度来描述抗性菌株的情况,对预测未来整个种群的行为和病害的控制具有决定性作用。

Avenot & Michailides (2007) 研究了开心果晚疫病菌抗啮酰菌胺菌株的适合度,发现抗、感菌株的适合度指标,如孢子萌发率、菌丝生长速率、产孢量和对开心果叶片的毒力均无明显差异。在黄瓜褐斑病菌 (Miyamoto et al., 2009) 中,野生抗啮酰菌胺菌株和敏感菌株的菌丝生长率无任何差异,且对黄瓜的致病性也相似。同样,Zhang et al. (2007) 也证明了灰葡萄孢菌的抗啮酰菌胺突变体和敏感菌株的菌丝生长率和孢子萌发率都无明显差异。而本研究发现番茄早疫病菌抗啮酰菌胺菌株菌丝的生长减慢,但产孢量增多,致病力增强,产毒量也有增加的趋势,表明番茄早疫病菌对啮酰菌胺产生抗性后,生产上推荐的浓度已无法有效控制病害,并且在无药剂压力的选择下病原菌的存活概率也比较高,这样在田间有利于形成优势群体。同时,在试验中发现中抗菌株 J9 的生长速率虽低于敏感菌株,但未达到显著水平,可能是由于菌株 J9 的 EC₅₀ 值 (5.46 μg/mL) 接

近于划分中抗水平的最低值(5 $\mu\text{g/mL}$), 对啉酰菌胺敏感性的变化幅度较小而造成的。另外, Avenot & Michailides (2010) 认为抗啉酰菌胺菌株与敏感菌株的混合接种试验是一种评价啉酰菌胺抗性菌株适合度的更具有现实意义的方法。因此, 后续试验中将进一步测定抗、感菌株在活体植株上的竞争力, 来完善适合度的内容, 合理预测持续增加的抗啉酰菌胺菌株的频率。

通常抗药性的产生还会伴随着生物学特性的变化, 因此生物学特性研究也是抗药性风险评价的一个重要指标(Ziogas et al., 2003)。本研究发现敏感菌株的最适温度 25℃ 与肖娱玉等(2010)报道相一致, 最适 pH 6~8 则与其报道有差异; 而当番茄早疫病菌对啉酰菌胺产生抗性后, 最适 pH 范围变宽, 中抗菌株的最适温度虽没有变化, 但是高抗和极高抗菌株的最适温度范围则变宽, 这些变化可降低环境因素(温度、pH 值)对抗性菌株生长的影响, 从而使其在与敏感菌株的竞争中存在一定的优势。肖娱玉等(2010)认为半乳糖和 KNO_3 对番茄早疫病菌菌丝的生长最为有利。而本研究认为敏感菌株的最适碳源为淀粉和乳糖、最适氮源为蛋白胨, 中抗菌株的最适碳、氮源没有发生变化, 而高抗和极高抗菌株的最适碳、氮源发生了变化。可见, 抗啉酰菌胺菌株对营养的要求有所变化, 可能是由于抗性菌株代谢机制的改变所引起的, 具体原因有待进一步研究。

综上所述, 番茄早疫病菌对啉酰菌胺产生抗性后, 适合度和生物学特性的变化都有利于抗性的发展。因此, 今后应当加强田间抗性监测, 及时了解各地区的抗性情况并制定合理的用药策略, 如降低啉酰菌胺的使用、轮换不同作用机制的药剂等, 以延缓抗性的发展、延长啉酰菌胺的使用期限。

参 考 文 献 (References)

- Amiri A, Brannen PM, Schnabel G. 2010. Reduced sensitivity in *Monilinia fructicola* field isolates from South Carolina and Georgia to respiration inhibitor fungicides. *Plant Disease*, 94(6): 737–743
- Avenot HF, Michailides TJ. 2007. Resistance to boscalid fungicide in *Alternaria alternata* isolates from pistachio in California. *Plant Disease*, 91(10): 1345–1350
- Avenot HF, Michailides TJ. 2010. Progress in understanding molecular mechanisms and evolution of resistance to succinate dehydrogenase inhibiting (SDHI) fungicides in phytopathogenic fungi. *Crop Protection*, 29(7): 643–651
- Avenot HF, 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, Thomas A, Gitaitis RD, Langston DB, Stevenson KL. 2012. Molecular characterization of boscalid- and penthiopyrad-resistant isolates of *Didymella bryoniae* and assessment of their sensitivity to fluopyram. *Pest Management Science*, 68(4): 645–651
- 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
- Dong JG. 2001. *Agricultural plant pathology* (north edition). Beijing: China Agriculture Press, pp. 385 (in Chinese) [董金泉. 2001. 农业植物病理学(北方本). 北京: 中国农业出版社, pp. 385]
- FRAC. 2009. FRAC code list: Fungicides sorted by mode of action (including FRAC code numbering). <http://www.frac.info>
- Gudmestad NC, Arabiat S, Miller JS, Pasche JS. 2013. Prevalence and impact of SDHI fungicide resistance in *Alternaria solani*. *Plant Disease*, 97(7): 952–960
- 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 Agriculture 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]
- Horsfield A, Wicks T, Davies K, Wilson D, Paton S. 2010. Effect of fungicide use strategies on the control of early blight (*Alternaria solani*) and potato yield. *Australasian Plant Pathology*, 39(4): 368–375
- Leroch M, Kretschmer M, Hahn M. 2011. Fungicide resistance phenotypes of *Botrytis cinerea* isolates from commercial vineyards in South West Germany. *Journal of Phytopathology*, 159(1): 63–65
- Mallik I, Arabiat S, Pasche JS, Bolton MD, Patel JS, Gudmestad NC. 2014. Molecular characterization and detection of mutations associated with resistance to succinate dehydrogenase-inhibiting fungicides in *Alternaria solani*. *Phytopathology*, 104(1): 40–49
- Miles TD, Fairchild KL, Merlington A, Kirk WW, Rosenzweig N, Wharton PS. 2013. First report of boscalid and penthiopyrad-

- resistant isolates of *Alternaria solani* causing early blight of potato in Michigan. *Plant Disease*, 97(12): 1655
- Miyamoto T, Ishii H, Seko T, Kobori S, Tomita Y. 2009. Occurrence of *Corynespora cassiicola* isolates resistant to boscalid on cucumber in Ibaraki Prefecture, Japan. *Plant Pathology*, 58(6): 1144–1151
- Miyamoto T, Ishii H, Tomita Y. 2010. Occurrence of boscalid resistance in cucumber powdery mildew in Japan and molecular characterization of the iron-sulfur protein of succinate dehydrogenase of the causal fungus. *Journal of General Plant Pathology*, 76(4): 261–267
- Pasche JS, Gudmestad NC. 2008. Prevalence, competitive fitness and impact of the F129L mutation in *Alternaria solani* from the United States. *Crop Protection*, 27(3/5): 427–435
- Pasche JS, Piche LM, Gudmestad NC. 2005. Effect of the F129L mutation in *Alternaria solani* on fungicides affecting mitochondrial respiration. *Plant Disease*, 89(3): 269–278
- 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. 抗啉酰菌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
- Xiao YY, Qu YF, Zhang Q, Pu GQ. 2010. Study on the biological characteristics of *Alternaria solani*. *Jiangsu Agricultural Sciences*, (3): 144–146 (in Chinese) [肖娱玉, 曲一凡, 张琪, 浦冠勤. 2010. 番茄早疫病菌生物学特性研究. *江苏农业科学*, (3): 144–146]
- Yin YN, Kim YK, Xiao CL. 2011. Molecular characterization of boscalid resistance in field isolates of *Botrytis cinerea* from apple. *Phytopathology*, 101(8): 986–995
- Zhang CQ, Yuan SK, Sun HY, Qi ZQ, Zhou MG, Zhu GN. 2007. Sensitivity of *Botrytis cinerea* from vegetable greenhouses to boscalid. *Plant Pathology*, 56(4): 646–653
- Ziogas BN, Markoglou AN, Malandrakis AA. 2003. Studies on the inherent resistance risk to fenhexamid in *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 109(4): 311–317
- Ziogas BN, Markoglou AN, Spyropoulou V. 2005. Effect of phenylpyrrole-resistance mutations on ecological fitness of *Botrytis cinerea* and their genetical basis in *Ustilago maydis*. *European Journal of Plant Pathology*, 113(1): 83–100

(责任编辑:高峰)