

大豆胶孢炭疽菌对苯醚甲环唑的抗性机制 及其抗性突变体的适合度



石妞妞¹ 阮宏椿¹ 陈文乐² 陈巧红³ 陈福如¹ 杜宜新^{1*}

(1. 福建省农业科学院植物保护研究所, 福建省作物有害生物监测与治理重点实验室, 福州 350013;

2. 三明市植保植检站, 福建 三明 365000; 3. 三明市农垦站, 福建 三明 365000)

摘要:为明确大豆胶孢炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides* 对苯醚甲环唑的抗性风险及其抗性机制, 采用药剂驯化法诱导获得其抗性突变体, 并测定抗性突变体的适合度和交互抗性, 同时分析抗性突变体和敏感菌株 *cyp51A* 和 *cyp51B* 基因的 cDNA 序列、启动区序列及相对表达量。结果表明: 从大豆胶孢炭疽菌 2 株敏感菌株中筛选获得 7 株低抗苯醚甲环唑的突变体, 突变频率为 1.75×10^{-4} , 其抗药性可以稳定遗传。抗性突变体与亲本敏感菌株在对温度的敏感性、菌丝生长速率、产孢量和致病力方面均存在一定差异。苯醚甲环唑与丙环唑之间存在中等交互抗性(相关系数为 0.80, $P < 0.05$), 苯醚甲环唑与咪鲜胺锰盐、多菌灵、氟啶胺和吡唑醚菌酯之间无交互抗性。抗性突变体 *cyp51A* 和 *cyp51B* 基因的 cDNA 序列未发生核苷酸突变, *cyp51A* 和 *cyp51B* 基因的启动区无插入片段。经苯醚甲环唑处理后, 4 株抗性突变体 lq27-7-1、lq27-7-2、lq30-2-1 和 lq30-2-2 的 *cyp51A* 基因相对表达量被诱导上调倍数显著高于亲本敏感菌株; 3 株抗性突变体 lq27-7-2、lq30-2-2 和 lq30-2-3 的 *cyp51B* 基因相对表达量被诱导上调倍数显著高于亲本敏感菌株。表明大豆胶孢炭疽菌对苯醚甲环唑的抗性风险为低至中等, 其抗性机制可能与 *cyp51* 基因的过表达有关。

关键词: 大豆炭疽病; 胶孢炭疽菌; 苯醚甲环唑; 抗性突变体; 适合度; 抗性机制

Resistance mechanisms and fitness of anthracnose pathogen *Colletotrichum gloeosporioides* mutants resistant to difenoconazole

Shi Niuniu¹ Ruan Hongchun¹ Chen Wenle² Chen Qiaohong³ Chen Furu¹ Du Yixin^{1*}

(1. Key Laboratory for Monitoring and Integrated Management of Crop Pests, Institute of Plant Protection, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, Fujian Province, China; 2. Sanming Plant Protection and Inspection Station, Sanming 365000, Fujian Province, China; 3. Sanming Agricultural Reclamation Station, Sanming 365000, Fujian Province, China)

Abstract: In order to assess the resistance risk of anthracnose pathogen *Colletotrichum gloeosporioides* to difenoconazole and clarify the underlying resistance mechanisms, difenoconazole-resistant mutants, which were induced by fungicide-taming method, were studied on the fitness and the cross-resistance. The full-length cDNA of resistance related genes *cyp51A* and *cyp51B*, and the promoter sequences were compared between resistant mutants and sensitive isolates, and the relative expression of *cyp51A* and *cyp51B*, were also investigated. The results showed that seven mutants with low resistance to difenocon-

基金项目: 福建省属公益项目(2020R10240010), 福建省农业农村厅项目(2021PZQS006), 福建省人民政府-中国农业科学院农业高质量发展超越“5511”协同创新工程(XTCXGC2021017, XTCXGC2021011), 福建省农业科学院农作物重大有害生物灾变机制与绿色防控科技创新团队项目(CXTD2021002-1)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: yixindu@163.com

收稿日期: 2021-12-16

azole were generated from two sensitive isolates, with a mutation frequency of 1.75×10^{-4} , and the resistance could be inherited steadily. Mycelial growth responses to temperature, mycelial growth rate, sporulation and pathogenicity differed between the mutants and the sensitive isolates. Moderate level cross-resistance was detected between difenoconazole and propiconazole (correlation coefficient was 0.80, $P < 0.05$) in these isolates, but no cross-resistance was observed between difenoconazole and prochloraz-Mn, carbendazim, fluazinam or pyraclostrobin. Sequence analysis of the full-length cDNA of *cyp51A* and *cyp51B*, and promoter region showed that there was no point mutation on all mutants and no inserted fragment in the promoter region. After treatment with difenoconazole, the expression of *cyp51A* was up-regulated more in four mutants lq27-7-1, lq27-7-2, lq30-2-1 and lq30-2-2 than that in their parent isolates. The expression of *cyp51B* was also up-regulated more in three mutants lq27-7-2, lq30-2-2 and lq30-2-3 than that in their parent isolates when exposed to difenoconazole. The results indicated that the resistance risk of *C. gloeosporioides* to difenoconazole is likely to be low to moderate, and the up-regulated expression of *cyp51* contribute at least partially to the resistance.

Key words: soybean anthracnose; *Colletotrichum gloeosporioides*; difenoconazole; resistance mutant; fitness; resistance mechanism

炭疽菌属 *Colletotrichum* 真菌是一类变异快、种类多、地理和寄主范围分布广泛且具有重要经济意义的病原菌 (Cannon et al., 2012; Yu et al., 2016; Shi et al., 2021)。炭疽病是大豆生产上的重要真菌病害之一, 在世界范围内普遍发生, 轻者减产, 重者绝收 (李海云等, 2017)。目前, 福建省大豆炭疽病的病原菌有 3 种, 分别为平头炭疽菌 *C. truncatum*、胶孢炭疽菌 *C. gloeosporioides* 和 *C. plurivorum*。

目前, 使用化学药剂是控制大豆炭疽病的主要手段 (詹家绥等, 2014)。苯醚甲环唑是使用最广泛的三唑类杀菌剂之一, 其通过杂环上的氮原子与羊毛甾醇 14 α 脱甲基酶的血红素-铁活性中心结合, 抑制 14 α 脱甲基酶的活性, 从而阻碍麦角甾醇的合成, 最终起到杀菌作用 (Shi et al., 2020)。苯醚甲环唑具有高效、广谱、低毒、用量低、持效期长且相对安全的特点, 对锈病、炭疽病、斑点落叶病和纹枯病等多种真菌病害具有良好的防治效果 (徐建强等, 2016; Wang et al., 2019)。近年来, 由于苯醚甲环唑的大量推广应用, 田间许多重要的病原菌对其产生了抗性。如小麦赤霉菌 *Fusarium graminearum* 对苯醚甲环唑已出现了抗性 (Rekanović et al., 2010); 苹果轮纹病菌 *Botryosphaeria dothidea* 已出现对苯醚甲环唑敏感性降低的亚群体 (刘保友等, 2013); 河南省小麦纹枯病菌 *Rhizoctonia cerealis* 对苯醚甲环唑的敏感性下降 (刘刚, 2016)。

杀菌剂抗性行动委员会 (fungicide resistance action committee, FRAC) 从杀菌剂的作用机理角度将苯醚甲环唑的固有抗性风险定为中等抗性风险

(FRAC, 2021)。大豆胶孢炭疽菌具有繁殖速度快、产孢量大和再侵染频繁的特性, FRAC 从病原菌特性的角度将胶孢炭疽菌固有抗性风险定为中等抗性风险 (FRAC, 2019)。目前, 大豆胶孢炭疽菌对苯醚甲环唑的抗性风险和抗性机制尚不清楚。因此, 本研究通过药剂驯化法诱导大豆胶孢炭疽菌对苯醚甲环唑的抗性突变体, 测定抗性突变体的适合度, 比较抗性突变体和敏感菌株靶标基因的序列差异和相对表达量, 明确大豆胶孢炭疽菌对苯醚甲环唑的抗药风险及其抗性机制, 以期合理为使用苯醚甲环唑防治大豆炭疽病提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株和大豆: 大豆胶孢炭疽菌敏感菌株 lq27 和 lq30, 由福建省农业科学院植物保护研究所植物病理研究室分离、鉴定并提供。大豆品种为毛豆 3 号, 由福建省农业科学院作物研究所提供, 于温室中种植, 行株距为 40 cm $\times$ 30 cm, 培育至大豆始荚期供试。

培养基: 马铃薯葡萄糖琼脂 (potato dextrose agar, PDA) 培养基成分为去皮马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 20 g、蒸馏水 1 L; 马铃薯葡萄糖液体 (potato dextrose broth, PDB) 培养基为不添加琼脂的 PDA 培养基。

药剂及试剂: 96.1% 苯醚甲环唑 (difenoconazole) 原药, 江苏耕耘化学有限公司; 96.5% 咪鲜胺锰盐 (prochloraz-Mn) 原药、98.0% 吡唑醚菌酯 (pyra-

clostrobilin)原药和98.1%多菌灵(carbendazim)原药,江苏辉丰生物农业股份有限公司;95%丙环唑(propiconazole)原药,江苏七州绿色化工有限公司;97%氟啶胺(fludioxonil)原药,日本石原产业株式会社;多菌灵使用0.1 mol/L盐酸溶液配成 1.0×10^4 $\mu\text{g/mL}$ 的母液,其余药剂均使用二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)配成 1.0×10^4 $\mu\text{g/mL}$ 的母液,备用。DNA提取试剂盒及真菌总RNA提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;pTOPO-Blunt Simple载体,Omega生物科技有限公司(广州);ChamQ SYBR qPCR Master Mix (Q311-02)、HiScript III All-in-one RT SuperMix,南京诺唯赞生物科技有限公司;大肠杆菌*Escherichia coli*感受态细胞DH5 α ,北京全式金生物技术股份有限公司;其余试剂均为国产分析纯。

仪器:C1000™普通PCR仪、CFX Connect™实时荧光定量PCR仪,美国Bio-Rad公司;GZX-300BS-III光照培养箱,帕瑞玛仪器设备有限公司。

1.2 方法

1.2.1 胶孢炭疽病菌抗苯醚甲环唑突变体的诱导

将胶孢炭疽病菌敏感菌株lq27和lq30分别在PDA平板上于28℃恒温黑暗培养5 d,从菌落边缘打取直径为5 mm的菌饼,接种至含有1 $\mu\text{g/mL}$ 苯醚甲环唑(前期预试验测得的 EC_{50})的PDA平板上于28℃恒温黑暗培养,待长出扇形突变后,转接至新的PDA平板上,于28℃恒温黑暗培养5 d后打取直径为5 mm的菌饼,转接至下一浓度继续诱导突变体,转接浓度逐步递增至5、10、50、100、200、500 $\mu\text{g/mL}$,直至含终浓度为500 $\mu\text{g/mL}$ 苯醚甲环唑的PDA平板上长出菌落为止,测定突变体的 EC_{50} ,并计算抗性倍数和抗性突变频率,抗性倍数=抗性突变体 EC_{50} /亲本敏感菌株 EC_{50} ;抗性突变频率=获得抗性菌株数/接种全部菌饼数 $\times 100\%$ 。根据抗性倍数将各突变体的抗性水平划分为敏感、低抗、中抗和高抗,其中,抗性倍数 ≤ 3 的为敏感菌株;3<抗性倍数 ≤ 10 的为低抗菌株;10<抗性倍数 ≤ 100 的为中抗菌株;100<抗性倍数的为高抗菌株(鲜菲等,2015)。

1.2.2 抗苯醚甲环唑突变体的适合度测定

抗药性遗传稳定性测定:将1.2.1获得的抗性突变体和2株敏感菌株lq27和lq30在不含药剂的PDA平板上于28℃恒温黑暗培养10代,采用菌丝生长速率法分别测定第1、5及10代菌株对苯醚甲环唑的 EC_{50} ,计算突变体抗药性变化系数,分析突变体抗性的遗传稳定性。抗药性变化系数=抗性突变体第10代抗性倍数/抗性突变体第1代抗性倍数。

温度敏感性测定:将1.2.1获得的抗性突变体和2株敏感菌株lq27和lq30在PDA平板上于28℃恒温黑暗培养5 d,从菌落边缘打取直径为5 mm的菌饼,将菌饼接种到新的PDA平板上,分别在16、20、25、28和37℃下黑暗培养7 d,采用十字交叉法测量菌落直径,每个温度处理3个重复。

菌丝生长速率测定:将1.2.1获得的抗性突变体和2株敏感菌株lq27和lq30在PDA平板上于28℃恒温黑暗培养5 d,从菌落边缘打取直径为5 mm的菌饼,将菌饼接种到新的PDA平板上,28℃恒温黑暗培养7 d,采用十字交叉法测量菌落直径,计算菌丝生长速率,菌丝生长速率=菌落直径/菌落生长天数。每株菌株3个重复。

产孢量测定:将1.2.1获得的抗性突变体和2株敏感菌株lq27和lq30在PDA平板上于28℃恒温黑暗培养5 d,从菌落边缘打取直径为5 mm的菌饼,并将菌饼接种至装有100 mL PDB培养基的三角瓶中,每瓶接种3个菌饼,于28℃、150 r/min条件下黑暗振荡培养7 d,采用血球计数板测定分生孢子浓度,计算产孢量,每株菌株3个重复。

致病力测定:将1.2.1获得的抗性突变体和2株敏感菌株lq27和lq30在PDA平板上于28℃恒温黑暗培养5 d,用打孔器在菌落边缘打取直径为5 mm的菌饼,将菌饼接种至装有100 mL PDB培养基的三角瓶中,于28℃、150 r/min条件下黑暗振荡培养7 d,用血球计数板测定分生孢子浓度,制成浓度为 1×10^5 个/mL的孢子悬浮液,备用。在温室内采用喷雾接种法将 1×10^5 个/mL的孢子悬浮液(含0.1%吐温80)喷雾接种于始荚期大豆幼嫩豆荚上,每株大豆接种50 mL孢子悬浮液,每株菌株接种6株大豆,于25~30℃覆膜保湿3 d后移去薄膜。接种14 d后进行病情调查,每个处理调查3株大豆的全部豆荚,统计豆荚总数和发病豆荚数,确定发病豆荚病级。大豆炭疽病病情分级标准参照大豆抗炭疽病鉴定技术规范(DB35/T 1574—2016)确定:0级,豆荚无病斑;1级,豆荚上有褐点型小病斑,病斑面积占整个豆荚面积的5%以下;3级,豆荚上出现典型病斑,病斑面积占整个豆荚面积的6%~10%;5级,豆荚上出现典型病斑,病斑面积占整个豆荚面积的11%~25%;7级,豆荚上出现典型病斑,病斑面积占整个豆荚面积的26%~50%;9级,豆荚上出现典型病斑,病斑面积占整个豆荚面积的50%以上。同时计算病情指数(disease index, DI), $DI = \sum(\text{各病级代表数值} \times \text{各病级豆荚数}) / (9 \times \text{调查总豆荚数}) \times 100$ 。试验

重复3次。

1.2.3 苯醚甲环唑与不同杀菌剂之间的交互抗性测定

采用菌丝生长速率法测定 1.2.1 获得的抗性突变体及 2 株敏感菌株 lq27 和 lq30 对不同杀菌剂的敏感性。用 DMSO 分别配制含系列质量浓度丙环唑(0.1、0.5、1、5、10 μg/mL)、咪鲜胺锰盐(0.01、0.1、1、5、10 μg/mL)、吡唑醚菌酯(0.01、0.05、0.5、5、10 μg/mL)、氟啶胺(0.01、0.05、0.1、0.5、1 μg/mL)的 PDA 平板,以加入相同体积分数 DMSO 的处理作为空白对照。用 0.1 mol/L 盐酸溶液配制含有系列浓度多菌灵(0.025、0.05、0.1、0.2、0.4 μg/mL)的 PDA 平板,以加入相同体积分数的 0.1 mol/L 盐酸溶液作为空白对照。将杀菌剂对供试菌株的 EC₅₀ 值转化为对数值,以苯醚甲环唑对抗性突变体及敏感菌株的 EC₅₀ 对数值作为 *x* 轴、其他几种药剂对抗性突变体及敏感菌株的 EC₅₀ 对数值分别作为 *y* 轴进行线性回归分析,采用 Spearman 相关系数法分析苯醚甲环唑与其他药剂的交互抗性(Du et al., 2021),计算相关系数 ρ ,并进行差异显著性分析。当 $P<0.05$ 时, $\rho<0.3$ 表示存在较低等交互抗性; $0.3\leq\rho<0.5$ 表示存在低等交互抗性; $0.5\leq\rho\leq0.8$ 表示存在中等交互抗性; $\rho>0.8$ 存在

明显交互抗性。

1.2.4 靶标基因 *cyp51A* 和 *cyp51B* 的扩增与序列分析

将 1.2.1 获得的抗性突变体和 2 株敏感菌株 lq27 和 lq30 在 PDA 平板上于 28℃ 黑暗培养 4 d 后,从菌落边缘打取 6 个直径为 5 mm 的菌饼,将菌饼接种至装有 50 mL PDB 培养基的三角瓶中,于 28℃、150 r/min 条件下黑暗振荡培养 4 d,无菌条件下过滤获得各菌株的菌丝体。按照石姐姐等(2022)方法采用 DNA 提取试剂盒提取供试菌株的总 DNA,参照 Chen et al.(2018)目标基因序列利用 Primer Premier 5 软件设计引物 CgAF1/CgAR1 和 CgBF2/CgBR1(表 1),分别扩增 *cyp51A* 和 *cyp51B* 基因序列。所有引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。50 μL PCR 反应体系:2×Phanta Flash Master Mix 25 μL、上下游引物各 2 μL、DNA 模板 1 μL、ddH₂O 20 μL。PCR 扩增条件:98℃ 预变性 30 s;98℃ 变性 10 s,56℃ 退火 5 s,72℃ 延伸 15 s,共 35 个循环;72℃ 最终延伸 1 min。PCR 产物经纯化后,将其连接到 pTO-PO-Blunt Simple 载体上,采用热激法将连接产物转化至大肠杆菌感受态细胞 DH5α 中,选取阳性转化子送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

表 1 本研究所用的引物序列
Table 1 The primer pairs used in this study

引物 Primer	引物序列(5'-3') Sequence (5'-3')	目的 Purpose
CgAF1	CAACACCGTAGCAGACCAGAAG	扩增 <i>cyp51A</i> 基因
CgAR1	CTTAGCCTTCGCTGTGGGTTG	Amplification of the <i>cyp51A</i> gene
CgAF2	ATGATGGAAGGCATAGAACT	扩增 <i>cyp51A</i> 基因的编码区
CgAR2	ATCGCGTCGGGTCCACCTGA	Amplify the <i>cyp51A</i> coding sequence
CgBF2	GATATGCGAGATGCGCTTGAC	扩增 <i>cyp51B</i> 基因
CgBR1	TCGACAGCGACCATCTTTAG	Amplification of the <i>cyp51B</i> gene
CgBF3	ATGGGTCTCCTGCAGGAG	扩增 <i>cyp51B</i> 基因的编码区
CgBR4	CGCCTCACGTTCTCCAGTAAAT	Amplify the <i>cyp51B</i> coding sequence
AF1	ATCAGCAACAGTTTCGTCCCG	扩增 <i>cyp51A</i> 基因 5'-UTR 区
AR1	GAAGACGGTTGGTGGTAAT	Amplification of the partial upstream regions of <i>cyp51A</i> gene
BF1	AATCATTCCTCGTCTCCC	扩增 <i>cyp51B</i> 基因 5'-UTR 区
BR1	GGCTCGTTGGCGTTCTT	Amplification of the partial upstream regions of <i>cyp51B</i> gene
C5AF1	CGAGTTCTTCACGGATGCCA	荧光定量 PCR 扩增 <i>cyp51A</i> 基因
C5AR1	TGACACCCAAGTTGAGATACGC	Real-time PCR primer for <i>cyp51A</i>
C5AF3	ACCTACAAGAACGGCACCAAG	荧光定量 PCR 扩增 <i>cyp51B</i> 基因
C5AR3	ATCTGGGGGTACTGAGCGAGA	Real-time PCR primer for <i>cyp51B</i>
RT-TubGF	TCTCGATGTTATCCGCCG	内参 β -tubulin 基因
RT-TubGR	TGAGCTCAGGAACACTGACG	Real-time PCR primer for β -tubulin

抗性突变体和敏感菌株菌丝体的制备同上,采用真菌总 RNA 提取试剂盒提取其 RNA,利用 HiScript III All-in-one RT SuperMix 将 RNA 反转录合成 cDNA,作为模板进行 PCR 扩增。利用引物对 CgAF2/CgAR2 和 CgBF3/CgBR4(表 1)分别扩增目

的基因 *cyp51A* 和 *cyp51B* 的 cDNA 全长序列。扩增条件、体系及 PCR 产物处理方式同上。利用 DNAMAN 5.2.2.0 软件比对分析抗性突变体 *cyp51A* 和 *cyp51B* 基因的编码区核苷酸及氨基酸变化。

利用已制备的抗性突变体和敏感菌株 lq27 和

lq30的总DNA作为模板,分别使用引物对AF1/AR1和BF1/BR1(表1)扩增抗性突变体和敏感菌株靶标基因 *cyp51A* 及 *cyp51B* 的5'端非翻译区(5'-untranslated region, 5'-UTR)。PCR反应体系同上。扩增条件:98℃预变性30 s;98℃变性10 s,56℃退火5 s,72℃延伸10 s,共35个循环;72℃最终延伸1 min。PCR产物经纯化后,将其连接到pTOPO-Blunt Simple载体上,采用热激法将连接产物转化至大肠杆菌感受态细胞DH5 α ,选取阳性转化子送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。利用DNAMAN 5.2.2.0软件比对分析突变体5'-UTR的核苷酸序列变化。

1.2.5 靶标基因 *cyp51A* 和 *cyp51B* 的相对表达量分析

将1.2.1获得的抗性突变体和2株敏感菌株lq27和lq30在PDA平板上于28℃恒温黑暗培养5 d,从菌落边缘打取直径为5 mm的菌饼,将菌饼接种至PDB培养基中,于28℃、150 r/min条件下黑暗振荡培养6 d,加入终浓度为3 μ g/mL的苯醚甲环唑处理24 h,收集菌丝,采用1.2.4方法提取不同菌株的RNA。利用HiScript III All-in-one RT SuperMix将RNA反转录合成cDNA,以cDNA为模板,分别利用引物对C5AF1/C5AR1及C5AF3/C5AR3(表1)扩增 *cyp51A* 和 *cyp51B* 基因片段。20 μ L反应体系:2 $\times$ ChamQ SYBR qPCR Master Mix 10.0 μ L、10 μ mol/L

上下游引物各0.4 μ L、cDNA 1.0 μ L、ddH₂O 8.2 μ L。反应条件:95℃预变性30 s;95℃变性5 s,60℃退火30 s,共40个循环。以 β -tubulin基因为内参基因进行定量分析。每个模板3次重复。试验重复3次。

1.3 数据分析

采用DPS 9.5软件对试验数据进行统计分析,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 胶孢炭疽菌抗苯醚甲环唑突变体的诱导及抗性

亲本敏感菌株lq27和lq30经苯醚甲环唑室内驯化后共获得7株抗性突变体,分别为lq27-1、lq27-7-1、lq27-7-2、lq30-1、lq30-2-1、lq30-2-2和lq30-2-3,抗性突变频率为 1.75×10^{-4} 。抗性突变体的EC₅₀介于1.37~3.90 μ g/mL之间,抗性倍数介于3.21~8.16倍之间,7株抗性突变体均为低抗苯醚甲环唑菌株(表2)。

2.2 大豆胶孢炭疽菌抗性突变体的适合度分析

2.2.1 抗性突变体的抗性遗传稳定性

7株抗性突变体经继代培养后,第5代和第10代的抗性倍数分别为3.44~8.16倍和3.42~7.97倍(表2)。7株抗性突变体的抗药性变化系数介于0.92~1.07之间(表2),表明抗性突变体对苯醚甲环唑的抗性能稳定遗传。

表2 大豆胶孢炭疽菌抗苯醚甲环唑突变体的抗性倍数及抗性稳定性

Table 2 Resistance factor and resistance stability in difenoconazole-resistant mutants of *Colletotrichum gloeosporioides*

亲本或突变体 Isolate or mutant	EC ₅₀ /(μ g/mL)			抗性倍数 Resistance factor			抗药性 变化系数 Factor of sensitivity change	抗性水平 Resistance level
	第1代 The first generation	第5代 The fifth generation	第10代 The tenth generation	第1代 The first generation	第5代 The fifth generation	第10代 The tenth generation		
lq27*	0.43	0.43	0.43	/	/	/	/	
lq27-1	1.37	1.47	1.47	3.21	3.44	3.43	1.07	低抗 Low resistance
lq27-7-1	1.79	1.78	1.69	4.19	4.17	3.94	0.94	低抗 Low resistance
lq27-7-2	1.59	1.47	1.46	3.71	3.44	3.42	0.92	低抗 Low resistance
lq30*	0.48	0.48	0.47	/	/	/	/	
lq30-1	1.82	1.80	1.72	3.82	3.79	3.66	0.96	低抗 Low resistance
lq30-2-1	2.61	2.60	2.55	5.47	5.47	5.42	0.99	低抗 Low resistance
lq30-2-2	3.90	3.88	3.60	8.16	8.16	7.65	0.94	低抗 Low resistance
lq30-2-3	3.86	3.82	3.75	8.06	8.04	7.97	0.99	低抗 Low resistance

所示为亲本敏感菌株,其余菌株为抗性突变体。 indicates sensitive isolates, while the others are resistant isolates.

2.2.2 抗性突变体对温度的敏感性

抗性突变体与敏感菌株对温度的敏感性存在差异。抗性突变体与敏感菌株的菌落直径均在28℃时最大,分别达73.00~78.33 mm和80.67~81.00 mm,而均在37℃最小,分别为5.00~10.67 mm和11.33~11.67 mm;在25℃时抗性突变体的菌落直径仅次于

28℃时,且均显著小于敏感菌株的菌落直径;在16℃和20℃时抗性突变体的菌落直径与敏感菌株的菌落直径相当(表3)。

2.2.3 抗性突变体的生长速率、产孢量及致病力

抗性突变体lq27-7-2在28℃时的菌丝生长速率与敏感菌株lq27相当,分别为11.19 mm/d和

11.52 mm/d,其他抗性突变体在 28℃时的生长速率均显著低于敏感菌株。抗性突变体 lq27-1 和 lq27-7-2 的产孢量均显著高于敏感菌株 lq27,分别达到 9.24×10^9 个/mL 和 9.38×10^9 个/mL,而抗性突变体 lq27-7-1 的产孢量显著低于敏感菌株 lq27;抗性突变体 lq30-1、lq30-2-1、lq30-2-2 和 lq30-2-3 的产孢量介于 $12.13\times 10^9\sim 15.64\times 10^9$ 个/mL 之间,均显著高于敏感菌株 lq30 的产孢量。抗性突变体 lq27-7-2、lq30-1、lq30-2-1、lq30-2-2 和 lq30-2-3 的致病力显著强于敏感菌株,病情指数分别为 34.70、61.80、48.01 和 50.24;而抗性突变体 lq27-1 和 lq27-7-1 的致病力显著弱于敏感菌株(表 4)。

表 3 大豆胶孢炭疽菌抗苯醚甲环唑突变体及其亲本敏感菌株对温度的敏感性
Table 3 Effects of temperatures on the mycelial growth of difenoconazole-resistant mutants and their parent sensitive isolates of *Colletotrichum gloeosporioides*

亲本或突变体 Isolate or mutant	菌落直径 Colony diameter/mm				
	16℃	20℃	25℃	28℃	37℃
lq27*	33.00±1.00 b	57.00±1.00 a	76.33±1.53 a	80.67±0.58 a	11.67±1.15 a
lq27-1	29.00±0.00 c	29.33±0.58 c	68.00±1.00 c	75.33±1.15 b	7.33±0.58 b
lq27-7-1	36.33±0.58 a	55.67±1.15 a	71.67±0.58 b	75.00±3.46 b	5.00±0.00 c
lq27-7-2	27.33±0.58 d	46.33±0.58 b	71.00±1.00 b	78.33±3.21 ab	5.00±0.00 c
lq30*	34.00±1.00 a	57.00±1.00 a	77.33±1.15 a	81.00±1.00 a	11.33±0.58 a
lq30-1	28.00±0.00 c	56.00±2.00 a	67.00±1.00 d	74.00±0.00 bc	10.67±0.58 a
lq30-2-1	33.00±0.00 b	52.00±1.73 b	70.00±0.00 c	73.67±1.15 bc	9.00±0.00 bc
lq30-2-2	33.00±0.00 b	55.00±1.00 a	68.00±0.00 d	73.00±0.00 c	9.67±0.58 b
lq30-2-3	34.33±0.58 a	55.00±0.00 a	73.00±0.00 b	75.00±0.00 b	8.67±0.58 c

表中数据为平均数±标准差。同列数据后不同小写字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验差异显著($P<0.05$)。*所示为亲本敏感菌株,其余菌株为抗性突变体。Data are mean±SD. Different lowercase letters in the same column indicate significant difference by Duncan's new multiple range test ($P<0.05$). * indicates sensitive isolates, while the others are resistant isolates.

表 4 大豆胶孢炭疽菌抗苯醚甲环唑突变体及其亲本敏感菌株的生长速率、产孢量和致病力
Table 4 Growth rate, sporulation and pathogenicity of the resistant-mutants and their parent sensitive isolates of *Colletotrichum gloeosporioides*

亲本敏感菌株或突变体 Isolate or mutant	生长速率 Growth rate/(mm/d)	产孢量 Sporulation/($\times 10^9$ 个/mL)	病情指数 Disease index
lq27*	11.52±0.08 a	7.69±0.05 c	24.00±0.64 b
lq27-1	10.76±0.17 b	9.24±0.03 b	18.29±0.33 d
lq27-7-1	10.71±0.50 b	1.76±0.02 d	22.29±0.82 c
lq27-7-2	11.19±0.46 ab	9.38±0.01 a	34.70±1.07 a
lq30*	11.57±0.14 a	10.64±0.01 e	34.36±2.79 d
lq30-1	10.57±0.00 bc	14.25±0.02 b	61.80±1.41 a
lq30-2-1	10.52±0.16 c	12.76±0.01 c	41.14±0.54 c
lq30-2-2	10.43±0.00 c	15.64±0.01 a	48.01±0.86 b
lq30-2-3	10.71±0.00 b	12.13±0.01 d	50.24±1.09 b

表中数据为平均数±标准差。同列数据后不同小写字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验差异显著($P<0.05$)。*所示为亲本敏感菌株,其余菌株为抗性突变体。Data are mean±SD. Different lowercase letters in the same column indicate significant difference by Duncan's new multiple range test ($P<0.05$). * indicates sensitive isolates, while the others are resistant isolates.

2.3 苯醚甲环唑与不同杀菌剂之间的交互抗性

抗性突变体及其敏感菌株对苯醚甲环唑的敏感性与其对丙环唑的敏感性之间的相关系数为 0.80,且 $P<0.05$,表明抗性突变体对丙环唑的敏感性显著下降,苯醚甲环唑与丙环唑之间存在中等交互抗性。抗性突变体及敏感菌株对苯醚甲环唑的敏感性与其对咪鲜胺锰盐、多菌灵、氟啶胺及吡唑醚菌酯的

敏感性之间的相关性不显著,表明苯醚甲环唑与咪鲜胺锰盐、多菌灵、氟啶胺及吡唑醚菌酯之间无交互抗性(图 1)。

2.4 抗性和敏感菌株的 *cyp51A* 和 *cyp51B* 序列分析

大豆胶孢炭疽菌 *cyp51A* 基因序列全长 1 658 bp (GenBank 序列号为 OL845618),含有 3 个外显子和 2 个内含子,cDNA 全长为 1 542 bp。敏感菌株和抗

性突变体 *cyp51A* 基因的 cDNA 序列完全相同, 未出现核苷酸突变。大豆胶孢炭疽菌 *cyp51B* 基因序列全长 1 723 bp (GenBank 序列号为 OL845619), 含有 3 个外显子和 2 个内含子, cDNA 全长为 1 581 bp。敏感菌株和抗性突变体的 *cyp51B* 基因 cDNA 序列

完全相同, 未出现核苷酸突变。敏感菌株和抗性突变体的 *cyp51A* 和 *cyp51B* 基因启动子区序列均未出现插入的序列片段。综上表明抗性突变体的抗性机制与 *cyp51A* 和 *cyp51B* 基因的点突变无关。

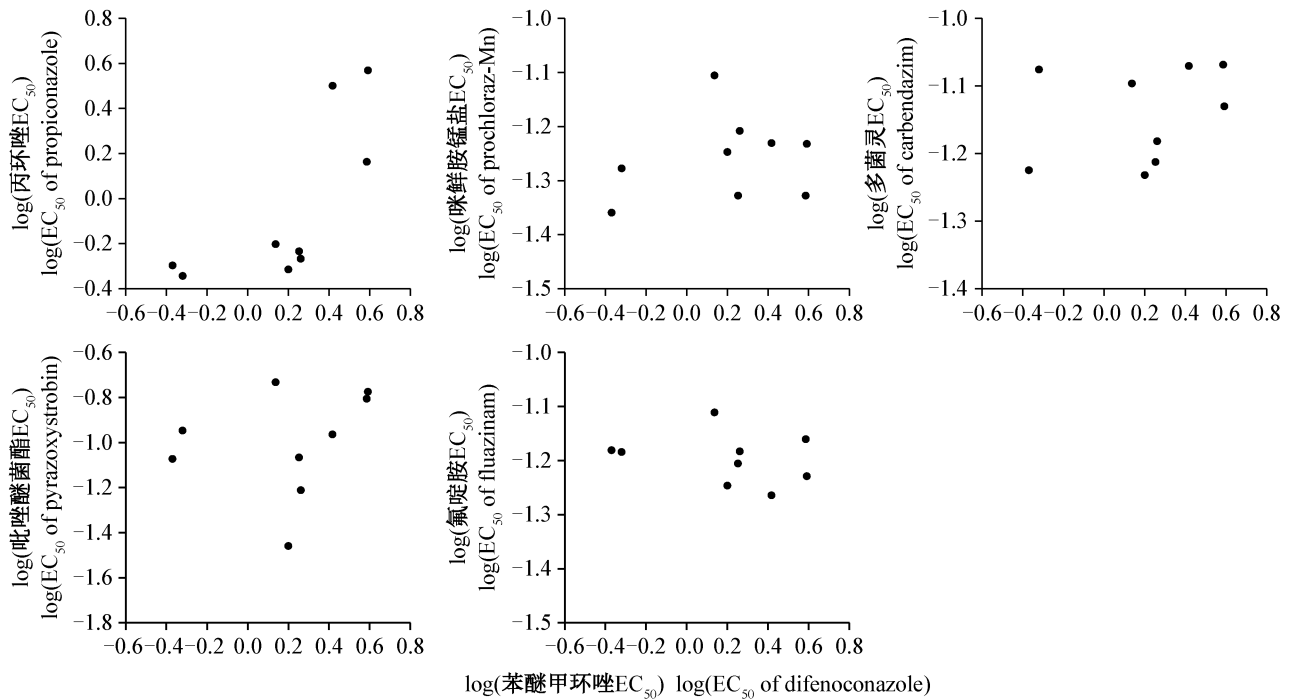


图1 苯醚甲环唑与不同杀菌剂之间的交互抗性

Fig. 1 Cross-resistance between difenoconazole and some other fungicides

2.5 *cyp51A* 和 *cyp51B* 基因的相对表达量分析

在无苯醚甲环唑诱导处理下, 敏感菌株 lq27 与其抗性突变体的 *cyp51A* 基因相对表达量无显著差异, 而抗性突变体 lq30-2-3 的 *cyp51A* 基因相对表达量显著高于其亲本敏感菌株 lq30 的相对表达量 (图 2-A)。经苯醚甲环唑处理后, 敏感菌株 lq27 和 lq30 的 *cyp51A* 基因被诱导上调倍数分别为 2.88 倍和 2.80 倍; 抗性突变体 lq27-1、lq27-7-1 和 lq27-7-2 的 *cyp51A* 基因均被显著诱导上调表达, 上调倍数分别为 2.14 倍、5.39 倍和 43.70 倍, 其中, lq27-7-1 和 lq27-7-2 的 *cyp51A* 基因相对表达量被诱导上调倍数高于其亲本敏感菌株 lq27。抗性突变体 lq30-1 和 lq30-2-3 的 *cyp51A* 基因相对表达量被诱导上调倍数分别为 1.63 倍和 1.48 倍, 而抗性突变体 lq30-2-1 和 lq30-2-2 的 *cyp51A* 基因相对表达量被诱导上调倍数分别为 12.55 倍和 6.53 倍, 且高于其亲本敏感菌株 lq30 被诱导上调倍数 (图 2-A)。

在无苯醚甲环唑诱导处理下, 敏感菌株 lq27 的 *cyp51B* 基因相对表达量显著高于抗性突变体 lq27-

7-2 的 *cyp51B* 相对表达量, 而与抗性突变体 lq27-1 和 lq27-7-1 的 *cyp51B* 基因相对表达量差异不显著; 敏感菌株 lq30 的 *cyp51B* 基因相对表达量显著低于抗性突变体 lq30-2-2 和 lq30-2-3 的 *cyp51B* 基因相对表达量, 而与抗性突变体 lq30-1 和 lq30-2-1 的 *cyp51B* 基因相对表达量差异不显著 (图 2-B)。经苯醚甲环唑处理后, 敏感菌株 lq27 的 *cyp51B* 基因相对表达量被诱导上调倍数为 4.75 倍; 抗性突变体 lq27-7-2 的 *cyp51B* 基因相对表达量被诱导上调倍数为 28.15 倍, 而其余抗性突变体的 *cyp51B* 基因相对表达量被诱导上调倍数低于其敏感菌株; 敏感菌株 lq30 及其抗性突变体 lq30-1 和 lq30-2-1 的 *cyp51B* 基因相对表达量未被诱导表达, 而抗性突变体 lq30-2-2 和 lq30-2-3 的 *cyp51B* 基因被诱导上调表达倍数分别为 4.92 倍和 3.18 倍 (图 2-B)。

3 讨论

植物病原菌对杀菌剂产生抗性是其适应环境的结果, 是病原菌长期进化过程中的一种必然现象, 探

索产生抗药性的原因能有效规避抗性风险。三唑类杀菌剂通过抑制麦角甾醇的合成起到杀菌作用,该类杀菌剂的抗菌谱广,对大多数子囊菌、担子菌和半知菌均有较好的抑制活性(王晓坤等,2017),是防治作物炭疽病的主要杀菌剂。随着三唑类杀菌剂的大

量推广应用,田间许多重要的病原菌对其产生了抗性(Rallos & Baudoin 2016; Lichtemberg et al., 2017; 李宝燕等,2021)。据报道,大田葡萄和草莓上的胶孢炭疽菌已出现低抗苯醚甲环唑的亚群体(韩永超等,2016; Wang et al., 2020)。

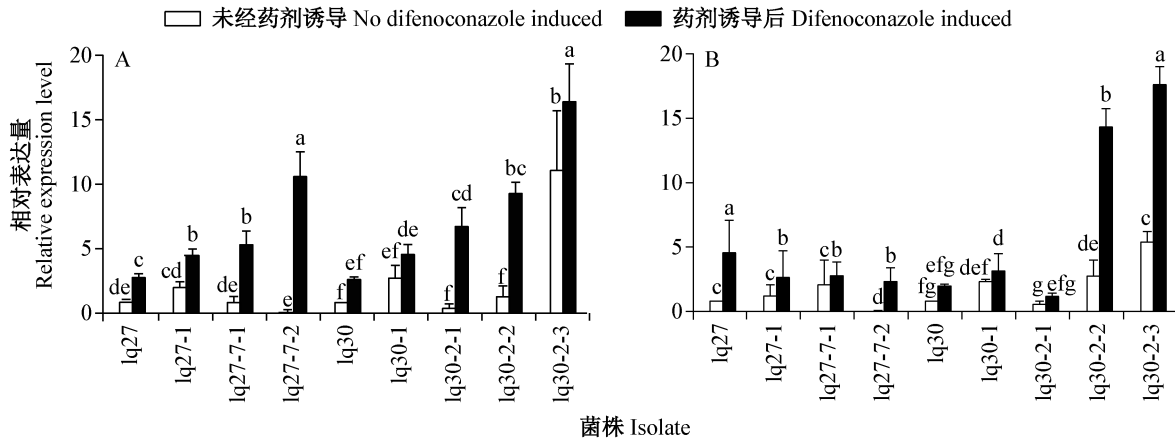


图2 大豆胶孢炭疽菌抗苯醚甲环唑突变体及其亲本敏感菌株 *cyp51A* (A)和 *cyp51B* (B)基因的相对表达量

Fig. 2 Relative expression levels of *cyp51A* (A) and *cyp51B* (B) in difenoconazole-resistant mutants of

Colletotrichum gloeosporioides and their parent sensitive isolates

图中数据为平均数±标准差。不同小写字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验各突变体与其亲本敏感菌株之间差异显著 ($P < 0.05$)。Data are mean±SD. Different lowercase letters indicate significant difference between mutants and their parent sensitive isolates by Duncan's new multiple range test ($P < 0.05$).

本研究通过室内药剂驯化筛选到7株低抗苯醚甲环唑的大豆胶孢炭疽菌,且这些抗性突变体的抗药性能稳定遗传。史晓晶等(2019)通过室内紫外诱变筛选到中抗苯醚甲环唑的番茄早疫病菌 *Alternaria solani*,但是这些抗性突变体的抗药性不能稳定遗传,这可能与菌株自身特性相关。另外,本研究对抗性突变体的适合度进行了测定,发现部分抗性突变体的菌丝生长速率、产孢量及致病力强于其亲本敏感菌株,适合度高则在田间群体竞争中具有优势。交互抗性研究发现,抗性突变体在苯醚甲环唑与丙环唑之间存在中等交互抗性,这与多种病原菌对三唑类杀菌剂产生交互抗性的结果相符(Du et al., 2021; 李宝燕等,2021)。抗性突变体在苯醚甲环唑与咪鲜胺锰盐之间无交互抗性,这可能与咪鲜胺锰盐是咪唑类杀菌剂,其作用位点与苯醚甲环唑存在差异有关,这在其他病原菌防治药剂的交互抗性研究中也有类似报道(Zhang et al., 2017; Wei et al., 2020)。另有研究表明,当田间抗性频率处于低抗频率时,停止使用该杀菌剂或换用不同作用机制的杀菌剂,可以降低该杀菌剂的选择压力,在一定程度上可恢复病原菌对杀菌剂的敏感性(任璐等,2015)。因此,将苯醚甲环唑与不同作用机制的杀菌剂轮换

或混配使用对延缓大豆胶孢炭疽菌对苯醚甲环唑的抗性发展具有重要意义。

甾醇 14 α -脱甲基化酶(sterol 14 alpha-demethylase, CYP51)是生物体内甾醇生物合成所必需的物质,是三唑类杀菌剂的作用靶标。在不同丝状真菌中,CYP51的拷贝数存在差异,介于1~3个拷贝之间(Becher et al., 2011; Du et al., 2021)。在具有多个CYP51拷贝的真菌中,对三唑类药物的抗性通常与CYP51A的点突变相关(Délye et al., 1998; Song et al., 2018)。烟曲霉 *Aspergillus fumigatus* 含有CYP51A和CYP51B两个基因,与抗性相关的点突变只发生在CYP51A上(Garcia-Effron et al., 2005)。但是,也有报道表明,除CYP51A的点突变外,CYP51B的点突变也与病原菌对三唑类杀菌剂产生抗性有一定的关系。如辣椒胶孢炭疽菌对戊唑醇、葡萄胶孢炭疽菌对苯醚甲环唑的抗性与CYP51A和CYP51B的点突变都有关(Wang et al., 2020; Wei et al., 2020)。本研究中,大豆胶孢炭疽菌低抗苯醚甲环唑突变体的CYP51A和CYP51B均未发生点突变,表明大豆胶孢炭疽菌对苯醚甲环唑的抗性可能不是由靶蛋白的点突变引起的。

靶标基因的过表达也是病原菌对三唑类杀菌剂

产生抗性的主要因素之一。如指状青霉 *Penicillium digitatum* 对抑霉唑的抗性机制不仅与靶基因的点突变相关,也与 *cyp51* 基因的过表达相关(Ghosoph et al., 2007; Sun et al., 2011)。辣椒平头炭疽病菌 *C. truncatum* 对咪鲜胺、戊唑醇和苯醚甲环唑的抗性就与 *cyp51* 基因的过表达有关(Zhang et al., 2017);平头炭疽菌对三唑类杀菌剂的抗性可能与ABC(ATP binding cassette transporter)转运蛋白或MFS(major facilitator superfamily)转运蛋白的过表达有关(Kretschmer et al., 2009)。本研究中,大豆胶孢炭疽菌2株敏感菌株及其抗性突变体的 *cyp51A* 基因均被诱导上调表达,且在抗性突变体中的表达量被诱导上调的倍数显著高于其亲本敏感菌株被诱导上调的倍数,表明大豆胶孢炭疽菌对苯醚甲环唑的抗性机制可能与 *cyp51* 基因的过表达有关,这有待于今后进一步研究验证。

参 考 文 献 (References)

- Becher R, Weihmann F, Deising HB, Wirsig SG. 2011. Development of a novel multiplex DNA microarray for *Fusarium graminearum* and analysis of azole fungicide responses. BMC Genomics, 12: 52
- Cannon PF, Damm U, Johnston PR, Weir BS. 2012. *Colletotrichum*: current status and future directions. Studies in Mycology, 73(1): 181–213
- Chen SN, Wang YY, Schnabel G, Peng CA, Lagishetty S, Smith K, Luo CX, Yuan HZ. 2018. Inherent resistance to 14 α -demethylation inhibitor fungicides in *Colletotrichum truncatum* is likely linked to *CYP51A* and/or *CYP51B* gene variants. Plant Disease, 108(11): 1263–1275
- Délye C, Bousset L, Corio-Costet MF. 1998. PCR cloning and detection of point mutations in the eburicol 14 α -demethylase (CYP51) gene from *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*, a “recalcitrant” fungus. Current Genetics, 34(5): 399–403
- Du YX, Shi NN, Ruan HC, Miao JQ, Yan H, Shi CX, Chen FR, Liu XL. 2021. Analysis of the prochloraz-Mn resistance risk and its molecular basis in *Mycogone rosea* from *Agaricus bisporus*. Pest Management Science, 77(10): 4680–4690
- FRAC. 2019. FRAC code list 2019: pathogen risk list. <https://www.frac.info/docs/default-source/publications/pathogen-risk/frac-pathogen-list-2019.pdf>
- FRAC. 2021. FRAC code list 2021: fungal control agents sorted by cross resistance pattern and mode of action (including coding for FRAC Groups on product labels). https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2021--final.pdf?sfvrsn=f7ec499a_2
- Garcia-Effron G, Mellado E, Gomez-Lopez A, Alcazar-Fuoli L, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. 2005. Differences in interactions between azole drugs related to modifications in the 14- α sterol demethylase gene (*cyp51A*) of *Aspergillus fumigatus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 49(5): 2119–2121
- Ghosoph JM, Schmidt LS, Margosan DA, Smilanick JL. 2007. Imazalil resistance linked to a unique insertion sequence in the *PdCYP51* promoter region of *Penicillium digitatum*. Postharvest Biology and Technology, 44(1): 9–18
- 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]
- 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
- Li BY, Shi J, Tian YY, Nie LX, Wang YZ. 2021. The sensitivity to imazalil and cross-resistance against several other fungicides in grapevine white rot pathogen *Coniella diplodiella*. Journal of Plant Protection, 48(4): 774–780 (in Chinese) [李宝燕, 石洁, 田园园, 聂乐兴, 王英姿. 2021. 葡萄白腐病菌对抑霉唑的敏感基线及其与不同杀菌剂的交互抗性. 植物保护学报, 48(4): 774–780]
- Li HY, Jin S, Zhang XQ, Fan GH, Zhang JX, Xu YX. 2017. Identification of *Colletotrichum chlorophyti* causing soybean anthracnose. Plant Protection, 43(2): 163–166 (in Chinese) [李海云, 靳帅, 张学勤, 范光辉, 张建新, 许艳霞. 2017. 大豆炭疽病菌 *Colletotrichum chlorophyti* 的鉴定. 植物保护, 43(2): 163–166]
- Lichtemberg PSF, Luo Y, Morales RG, Muehlmann-Fischer JM, Michailides TJ, de Mio LLM. 2017. The point mutation G461S in the *MfCYP51* gene is associated with tebuconazole resistance in *Monilinia fructicola* populations in Brazil. Phytopathology, 107(12): 1507–1514
- Liu BY, Zhang W, Luan BH, Wang PS, Wang YZ. 2013. Sensitivity of *Botryosphaeria dothidea* to difenoconazole and flusilazole and cross-resistance of different fungicides. Acta Phytopathologica Sinica, 43(5): 541–548 (in Chinese) [刘保友, 张伟, 栾炳辉, 王培松, 王英姿. 2013. 苹果轮纹病菌对苯醚甲环唑和氟硅唑的敏感性及其交互抗性. 植物病理学报, 43(5): 541–548]
- 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]
- Rallos LEE, Baudoin AB. 2016. Co-occurrence of two allelic variants of CYP51 in *Erysiphe necator* and their correlation with over-expression for DMI resistance. PLoS ONE, 11(2): e0148025
- Rekanović E, Mihajlović M, Potočnik I. 2010. *In vitro* sensitivity of *Fusarium graminearum* (Schwabe) to difenoconazole, prothioconazole and thiophanatemethyl. Pesticide Phytomedicine, 25

- (4): 325–333
- 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]
- Shi NN, Ruan HC, Gan L, Dai YL, Yang XJ, Du YX, Chen FR. 2020. Evaluating the sensitivities and efficacies of fungicides with different modes of action against *Phomopsis asparagi*. *Plant Disease*, 104(2): 448–454
- Shi NN, Ruan HC, Jie YL, Chen FR, Du YX. 2021. Characterization, fungicide sensitivity and efficacy of *Colletotrichum* spp. from chili in Fujian, China. *Crop Protection*, 143: 105572
- Shi NN, Ruan HC, Jie YL, Chen FR, Du YX. 2022. Isolation and identification of *Colletotrichum* species associated with soybean anthracnose in Fujian Province. *Journal of Plant Protection*, 49(2): 539–546 (in Chinese) [石姐姐, 阮宏椿, 揭宇琳, 陈福如, 杜宜新. 2022. 福建省大豆炭疽病原菌的分离与鉴定. *植物保护学报*, 49(2): 539–546]
- Shi XJ, Ren L, Wang HJ, Han JY. 2019. Sensitivity of early blight pathogen *Alternaria solani* to difenoconazole and fitness of resistant mutants. *Journal of Plant Protection*, 46(1): 201–207 (in Chinese) [史晓晶, 任璐, 王华杰, 韩佳音. 2019. 山西省番茄早疫病病菌对苯醚甲环唑的敏感性及其抗性突变体的适合度. *植物保护学报*, 46(1): 201–207]
- Song JX, Zhang SZ, Lu L. 2018. Fungal cytochrome P450 protein Cyp51: what we can learn from its evolution, regulons and Cyp51-based azole resistance. *Fungal Biology Reviews*, 32(3): 131–142
- Sun XP, Wang JY, Feng D, Ma ZH, Li HY. 2011. PdCYP51B, a new putative sterol 14 α -demethylase gene of *Penicillium digitatum* involved in resistance to imazalil and other fungicides inhibiting ergosterol synthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(4): 1107–1119
- Wang J, Shi DY, Wei LL, Chen WC, Ma WW, Chen CJ, Wang K. 2020. Mutations at sterol 14 α -demethylases (CYP51A&B) confer the DMI resistance in *Colletotrichum gloeosporioides* from grape. *Pest Management Science*, 76(12): 4093–4103
- Wang SQ, Ma J, Wang M, Wang XH, Li YQ, Chen J. 2019. Combined application of *Trichoderma harzianum* SH2303 and difenconazole-propiconazole controlling southern corn leaf blight disease caused by *Cochliobolus heterostrophus* in maize. *Journal of Integrative Agriculture*, (9): 2063–2071
- 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]
- Wei LL, Chen WC, Zhao WC, Wang J, Wang BR, Li FJ, Wei MD, Guo J, Chen CJ, Zheng JQ, et al. 2020. Mutations and overexpression of *CYP51* associated with DMI-resistance in *Colletotrichum gloeosporioides* from chili. *Plant Disease*, 104(3): 668–676
- Xian F, Liu ST, Li Y, Chen J, Pei LL, Yu Y, Yang YH, Bi CW. 2015. Sensitivity base-line and resistance detection of *Magnaporthe grisea* to tebuconazole in southwest of China. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 17(6): 753–756 (in Chinese) [鲜菲, 刘顺涛, 李雨, 陈杰, 裴丽丽, 余洋, 杨宇衡, 毕朝位. 2015. 西南地区稻瘟病菌对戊唑醇的敏感性基线建立及抗性监测. *农药学报*, 17(6): 753–756]
- 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]
- Yu CW, Xin YH, Lu W, Xiao B, Wang XC, Yang YJ. 2016. Diverse *Colletotrichum* species cause anthracnose of tea plants (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) in China. *Scientific Reports*, 6: 35287
- Zhan JS, Wu EJ, Liu XL, Chen FP. 2014. Molecular basis of resistance of phytopathogenic fungi to several site-specific fungicides. *Scientia Agricultura Sinica*, 47(17): 3392–3404 (in Chinese) [詹家绥, 吴娥娇, 刘西莉, 陈凤平. 2014. 植物病原真菌对几类重要单位点杀菌剂的抗性分子机制. *中国农业科学*, 47(17): 3392–3404]
- Zhang C, Diao YZ, Wang WZ, Hao JJ, Imran M, Duan HX, Liu XL. 2017. Assessing the risk for resistance and elucidating the genetics of *Colletotrichum truncatum* that is only sensitive to some DMI fungicides. *Frontiers in Microbiology*, 8: 1779

(责任编辑:李美娟)