

辣椒根腐病菌对咯菌腈的敏感性及其抗性突变体的生物学性状

刘翔¹, 姜兴印^{1*}, 王雪婷¹, 朱文亚¹, 姚向峰², 王金花², 张凤文³

(1. 山东农业大学植物保护学院, 泰安 271018; 2. 山东农业大学资源与环境学院, 泰安 271018;
3. 中国农业科学院烟草研究所, 青岛 266101)

摘要 为明确辣椒根腐病致病菌腐皮镰孢 *Fusarium solani* 对咯菌腈的抗性风险, 采用菌丝生长速率法测定了采自未使用过咯菌腈的 5 个省份的 102 株腐皮镰孢对咯菌腈的敏感性。结果表明: 咯菌腈对 102 株腐皮镰孢的 EC_{50} 范围为 0.029 0~0.183 4 mg/L, 平均 EC_{50} 为 $(0.106 2 \pm 0.031 5)$ mg/L, 敏感性频率分布为连续单峰曲线, 所以可将其作为供试 5 个省份腐皮镰孢对咯菌腈的敏感基线。通过药剂驯化和紫外诱导并结合抗性遗传稳定性最终共获得 4 株腐皮镰孢抗咯菌腈突变体, 抗性水平在 6.94~32.43 倍之间, 突变频率分别为 3.51×10^{-4} (SDWF1914-Y336 和 SDWF1914-Y017) 和 7.41×10^{-9} (SDWF1914-ZR717 和 JSXZ1906-ZR496)。腐皮镰孢抗咯菌腈突变体生物学性状的研究表明, 抗性突变体在菌丝生长速率、产孢量与致病力方面与亲本菌株不存在显著差异。交互抗性测定结果显示, 腐皮镰孢对咯菌腈与啮菌酯、醚菌酯、多菌灵和福美双均无交互抗性。结果表明, 供试腐皮镰孢对咯菌腈较为敏感, 对咯菌腈的室内抗性风险等级为低至中等, 可作为防治辣椒根腐病的理想药剂, 建议在生产中将咯菌腈与不同作用机制的杀菌剂混用或交替使用。

关键词 腐皮镰孢; 咯菌腈; 敏感性; 抗性突变体; 生物学性状

中图分类号: S 481.4; S 482.2 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2022063

Sensitivity of *Fusarium solani* to fludioxonil and the biological characteristics of its resistant mutants

LIU Xiang¹, JIANG Xingyin^{1*}, WANG Xueting¹, ZHU Wenya¹, YAO Xiangfeng²,
WANG Jinhua², ZHANG Fengwen³

(1. College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China; 2. College of Resources and Environment, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China; 3. Institute of Tobacco Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Qingdao 266101, China)

Abstract The mycelial growth rate method was used to determine the sensitivity of 102 isolates of *Fusarium solani* to fludioxonil from five provinces where fludioxonil had not been used, aiming to clarify the resistance risk of *F. solani* to fludioxonil. The results indicated that the EC_{50} values of these isolates to fludioxonil ranged from 0.029 0 mg/L to 0.183 4 mg/L, with a mean EC_{50} value of $(0.106 2 \pm 0.031 5)$ mg/L. The frequency distribution of susceptibility was a continuous unimodal curve, which could be used as the susceptibility baseline of the tested *F. solani* isolates to fludioxonil in five provinces. Four fludioxonil-resistant isolates of *F. solani* were obtained through medicament domestication and ultraviolet induction combined with a resistance genetic stability test. The resistance level was between 6.94- and 32.43-fold, with a mutation frequency of 3.51×10^{-4} (SDWF1914-Y336 and SDWF1914-Y017) and 7.41×10^{-9} (SDWF1914-ZR717 and JSXZ1906-ZR496), respectively. The biological characteristics of the fludioxonil-resistant mutants of *F. solani* exhibited no significant difference from the parental isolates in terms of hyphal growth rate, sporulation, and pathogenicity. In addition, no cross-resistance

收稿日期: 2022-02-06

修订日期: 2022-05-09

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFD0201203); 山东“双一流”奖补项目(SYL2017-XTTD11)

* 通信作者 E-mail: xyjiang@sdau.edu.cn

was observed in *F. solani* isolates between fludioxonil and azoxystrobin, kresoxim-methyl, carbendazim, and thiram. The results suggested that the tested *F. solani* isolates were relatively sensitive to fludioxonil, and showed low to moderate resistance. In summary, fludioxonil is an ideal agent for controlling pepper root rot, but should be mixed or alternately used with other fungicides with various mechanisms of action in agricultural production.

Key words *Fusarium solani*; fludioxonil; sensitivity; resistant mutant; biological characteristics

辣椒是我国重要的经济作物,但生产中常因严重的病害问题导致经济损失。腐皮镰孢 *Fusarium solani* 引起的辣椒根腐病^[1-2]是影响田间辣椒生产最严重的病害之一。土壤中的病原菌厚垣孢子、菌核或菌丝体通常为侵染源^[3],土壤中的病菌翌年萌发产生的分生孢子也可以侵染致病。腐皮镰孢可从辣椒根和茎上的伤口处侵入维管束内,使植株发育不良,严重时会导致植株根系腐烂进而造成枯死现象^[4]。由于该病原菌在土壤中存活时间较长,加上长期连作,导致土壤质量不断下降,土壤中有益微生物的数量随病原菌积累而锐减^[5-6],在这种土壤中生长的辣椒更易得辣椒根腐病^[7-8]。因此,田间辣椒根腐病的发生不断加重。

目前辣椒根腐病的防治以化学防治为主,但在本研究启动时我国登记用于防治辣椒根腐病的化学药剂仅有 2 种,分别为二氯异氰尿酸钠(sodium dichloroisocyanurate)以及福美双(thiram)和多菌灵(carbendazim)组成的混剂。由于药剂种类稀少且连年用药,导致防治效果不断下降。多菌灵和福美双在田间防效下降甚至失败的案例已有发生,例如由镰孢菌引起的小麦赤霉病对多菌灵的抗性水平上升较快^[9]。多菌灵对绿豆根腐病有较好的防治作用,但田间连续使用后病菌已经产生抗药性^[10];因为抗性问题的存在,福美双对绿豆根腐病的防治效果也显著下降^[10]。因此,为延缓抗药性发生,避免对辣椒根腐病防治效果下降,亟须不同种类杀菌剂控制田间辣椒根腐病的发生。咯菌腈(fludioxonil)是一种低毒、高效的苯基吡咯类非内吸性广谱杀菌剂^[11-12],既可作为种子处理剂防治多种作物的土传和种传病害,亦可叶面喷施防治叶部病害,据报道对灰葡萄孢 *Botrytis cinerea* 有特效^[13]。已有研究表明,25 g/L 咯菌腈悬浮种衣剂可有效防治由多种镰孢菌引起的大豆根腐病和花生根腐病^[14];在筛选防治拟枝孢镰孢 *F. sporotrichioides* 引起的苜蓿根腐病的药剂试验中,50%咯菌腈可湿性粉剂有效剂量 250 g/hm² 时防效最好^[15]。可

见,咯菌腈对镰孢菌引起的作物根腐病普遍有较好的防治效果。

刘禹含等^[16]通过药剂驯化获得水稻恶苗病菌 *F. fujikuroi* 高抗咯菌腈的突变体,生物学测定结果表明,抗性突变体的适合度极高;纪军建等^[17]经过紫外诱导得到多株引起番茄灰霉病的灰葡萄孢 *B. cinerea* 咯菌腈抗性突变体,并且室内紫外诱导获得的抗咯菌腈突变体抗性可稳定遗传。由于病原菌自身特性、生长环境和防治药剂存在差异,因此,研究不同辣椒产区辣椒根腐病菌对咯菌腈的抗性风险具有重要意义。本研究通过菌丝生长速率法,测定了来自全国 5 个省份的 102 株辣椒根腐病菌对咯菌腈的敏感性,尝试建立其敏感基线,探究辣椒根腐病菌对咯菌腈产生抗性突变的可能性及所获抗药性突变体的生物学性状,旨在为咯菌腈防治辣椒病害提供科学合理的理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 菌株

2019 年在山东潍坊(SDWF)、湖南岳阳(HN-YY)、河北廊坊(HBLF)、江苏徐州(JSXZ)及四川成都(SCCD) 5 个辣椒产区采集辣椒根腐病发病维管束、病根,经分离纯化获得 102 株辣椒根腐病病原菌,转接于马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基上,于 4℃ 冰箱中保存,备用。

1.1.2 试验药剂

98% 咯菌腈原药和 95% 醚菌酯(kresoxim-methyl)原药,江苏耕耘化学有限公司;96.5% 啉菌酯(azoxystrobin)原药,江苏中旗科技股份有限公司;98% 多菌灵原药,江苏龙灯化学有限公司;95% 福美双原药,河北冠龙农化有限公司。

1.1.3 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA):马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂粉 16~20 g,去离子水 1 L;121℃ 高压灭菌 30 min。

绿豆培养基:绿豆 20 g, 蔗糖 20 g, 磷酸二氢钾 1.0 g, 去离子水 1 L; 121℃ 高压灭菌 30 min。

水琼脂培养基(WA):琼脂粉 10 g, 去离子水 1 L。

1.1.4 供试辣椒品种

‘辣帝 1 号’, 寿光欣欣然园艺有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 病原菌分子鉴定

随机选取 5 株采集、分离自不同地区的代表菌株 SDWF1914、JSXZ1906、HNY1908、HBLF1920、SC-CD1907, 刮取其在 PDA 培养基上正常生长的菌丝, 利用真菌 DNA 提取试剂盒提取病原菌 DNA, 用 ITS 通用引物 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 以及延伸因子 EF-1 α 引物 EF1[5'-ATGGGTAAGGA(A/G)GACAAGAC-3'] 和 EF2[5'-GGA(G/A)GTACCAGT(G/C)ATCATGTT-3'] 进行 PCR 扩增。

对纯化后的 PCR 扩增产物进行双向测序, 所得序列拼接后在 GenBank 中搜索与测试菌株相应序列相似度较高的序列及邻近种属序列, 并用 MEGA 7.0 软件以邻接法构建系统发育树。

1.2.2 腐皮镰孢对咯菌腈敏感基线的建立

采用菌丝生长速率法测定 102 株腐皮镰孢对咯菌腈的敏感性, 建立敏感基线。将咯菌腈溶于丙酮, 在预试验的基础上, 用含 0.1% 吐温-80(V/V) 的无菌去离子水稀释配制成咯菌腈质量浓度分别为 0.016、0.04、0.1、0.25、0.625 mg/L 的含药 PDA 平板, 以加入同体积含 0.1% 吐温-80 的无菌去离子水的 PDA 平板为对照。在已活化且菌丝生长至 3/4 皿的腐皮镰孢菌落边缘打取直径 5 mm 的菌饼, 菌丝面朝下接种至上述 PDA 平板, 每处理 3 次重复, 于 25℃ 黑暗条件恒温培养 7 d, 采用十字交叉法测量菌落直径, 计算菌丝生长抑制率, 建立毒力回归方程, 计算得到有效抑制中浓度(EC₅₀)。

1.2.3 腐皮镰孢抗咯菌腈突变体的获得

1.2.3.1 药剂驯化法

随机选取对咯菌腈敏感的腐皮镰孢菌株 SDWF1914、HBLF1911、JSXZ1906, 活化后转接于含 EC₅₀ 浓度咯菌腈的 PDA 平板上, 每代选取菌丝生长较快的菌落并于菌落边缘打取菌饼进行转接, 比较抗性变化, 逐步提高 PDA 平板中咯菌腈含量, 直至

能在含 0.5 mg/L(最低抑制浓度, MIC)咯菌腈的 PDA 平板上较好生长为止。每次试验打取 100 个菌饼, 每皿接种 1 个菌饼, 观察抗咯菌腈腐皮镰孢突变体抗性变化, 计算抗性水平和抗性突变频率^[18]。

$$RL = EC_{50(R)} / EC_{50(S)} \times 100\%;$$

$$RMF = RN / TN \times 100\%;$$

式中: RL 为抗性水平(%); EC₅₀ 为抑制中浓度; R 表示抗性突变体; S 代表亲本敏感菌株; RMF 为抗性突变频率; RN 为抗性突变体菌株数; TN 为抗性筛选试验中供试病原菌的菌饼总数。

1.2.3.2 紫外诱导法

参考 Lu 等^[19] 和 Bruin 等^[20] 的方法并加以改进, 选取对咯菌腈敏感的腐皮镰孢菌株 SDWF1914、HBLF1911 和 JSXZ1906, 挑取菌丝放入绿豆培养基中于 25℃ 黑暗条件下培养 5 d, 双层纱布过滤, 用无菌水稀释成 1×10⁵ 个/mL 的孢子悬浮液, 取 1 mL 孢子悬浮液涂布于 PDA 平板, 置于已预热 15 min 的紫外灯(20 W, 254 nm) 下 20 cm 处分别照射 40、60、80、100、120、140 s 和 160 s, 以未进行紫外灯照射的亲本菌株为对照。25℃ 黑暗条件下培养 3 d 后, 调查不同紫外照射时间下菌株的死亡率(显微镜视野中未萌发孢子数占视野中孢子总数的百分比), 获得紫外照射致使 95% 菌落死亡(即 95% 孢子不能正常萌发)的时间。取 1 mL 孢子悬浮液涂布于含 EC₅₀ 浓度咯菌腈的 PDA 平板上, 每个菌株一次试验涂布 100 个平板, 按使 95% 菌落死亡所需时间进行紫外照射后, 25℃ 黑暗条件恒温培养 5 d, 观察菌丝生长情况。将平板上长出的不规则扇形角突变菌落转移到 WA 培养基上, 显微镜下挑取单细胞菌丝进行菌株纯化。将纯化后的菌丝转接到含 0.5 mg/L(最低抑制浓度, MIC)咯菌腈的 PDA 平板上, 可正常生长的菌落为疑似抗性突变体, 利用菌丝生长速率法测定其 EC₅₀, 以未经紫外照射的亲本菌株作为对照, 计算抗性突变体的抗性水平和抗性突变频率。

$$RMF = AN / TN \times 100\%.$$

式中: AN 为抗性突变体菌株数, TN 为抗性筛选试验中供试病原菌的总孢子数。

1.2.4 抗性突变体的主要生物学性状研究

1.2.4.1 抗性遗传稳定性

在药剂驯化和紫外诱变获得的抗药性突变体及其亲本菌株的菌落边缘打取菌饼, 将菌饼转接到不

含药的 PDA 培养基平板上, 25℃ 黑暗条件下培养, 每 7 d 转接 1 次, 连续转接培养 12 代后, 以菌丝生长速率法分别测定第 1 代和第 12 代菌株对咯菌腈的敏感性。

1.2.4.2 适宜生长温度测定

打取抗性突变体及其亲本菌株菌饼, 转接到不含药的 PDA 培养基平板上, 25℃ 黑暗条件下培养 7 d 后, 打取直径为 5 mm 的菌饼转接到不含药的 PDA 培养基平板中央, 分别置于 15、25、35℃ 黑暗条件下培养 7 d, 十字交叉法测量菌落直径。每处理 3 次重复。测定温度对抗性突变体及其亲本菌株菌丝生长的影响。

1.2.4.3 产孢能力测定

打取抗性突变体及其亲本菌株菌饼, 接种于不含药的 PDA 培养基平板上 25℃ 黑暗条件下培养 7 d, 再次转接后在相同条件下培养 10 d, 加入 10 mL 无菌水, 收集孢子, 用血球计数板计算孢子浓度, 比较亲本敏感菌株与抗性突变体产孢能力。每个处理设 3 个重复。

1.2.4.4 致病力测定

采用麦粒接种的方法。供试菌株在 PDA 培养基平板上活化培养 7 d 后, 打取直径 5 mm 的菌饼, 放入盛有麦粒(提前浸泡并高压灭菌)的 100 mL 锥形瓶中, 每瓶放入 10 个菌饼。25℃ 黑暗条件下培养 7 d, 以盆栽辣椒苗为接种对象, 待辣椒苗定植后, 将带菌麦粒倒入根际周围土壤, 以不带腐皮镰孢的麦粒为空白对照。接种后辣椒放置于温度 25℃, 相对湿度 90%, 光周期 L//D=16 h//8 h 条件下培养 7 d, 分别测量发病植株病斑面积, 取平均值, 比较亲本敏感菌株与抗性突变体致病力差异。每处理设 3 个重复, 每重复 10 株辣椒。

1.2.4.5 交互抗药性测定

采用菌丝生长速率法分别测定抗性突变体及其亲本菌株对其他常规杀菌剂和田间主要使用药剂啉菌酯、醚菌酯、多菌灵及福美双的敏感性。根据皮尔逊相关系数 r 和 P 值来判断 2 种杀菌剂之间是否存在交互抗性^[21-22]。

1.3 数据处理

利用 SPSS 26.0 对数据进行统计分析。采用单因素方差分析检验腐皮镰孢抗咯菌腈突变体在菌丝生长速率、产孢量及致病力方面与亲本菌株是否存

在显著性差异, 若存在, 则进一步进行 Duncan 氏多重比较。

2 结果与分析

2.1 代表菌株的 rDNA-ITS 和 EF-1 α 序列分析

将供试菌株测序结果在 GenBank 数据库中进行 BLAST 比对, 结果(图 1, 图 2)显示采集、分离自不同地区的 5 株代表菌株与腐皮镰孢 *F. solani* 的 rDNA-ITS 和 EF-1 α 序列相似性均在 99% 以上。用 MEGA 7.0 软件, 采用邻接法构建系统发育树显示, 供试菌株皆与腐皮镰孢 *F. solani* 聚在同一分支, 支持率均达到 100%, 因此将引起辣椒根腐病的病原菌鉴定为腐皮镰孢 *F. solani*。

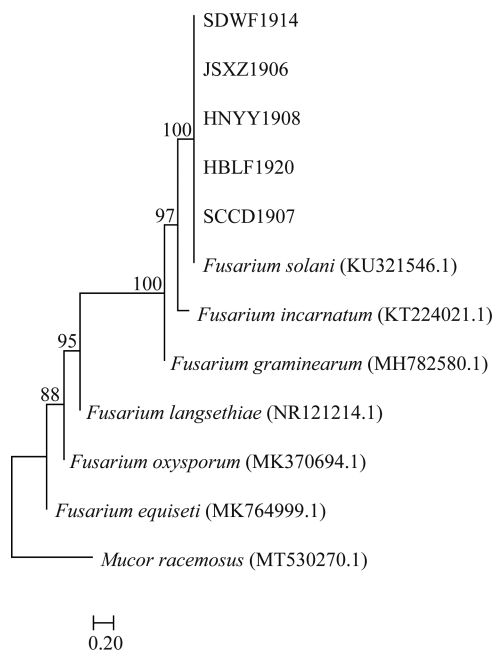


图 1 基于 rDNA-ITS 序列的辣椒根腐病病原菌代表菌株的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of representative isolates of pepper root rot pathogens based on rDNA-ITS sequences

2.2 腐皮镰孢对咯菌腈敏感基线的建立

测定结果显示: 供试 102 株腐皮镰孢对咯菌腈具有较高敏感性, EC_{50} 范围为 0.029 0~0.183 4 mg/L, 平均 EC_{50} 为 (0.106 2 $\pm$ 0.031 5) mg/L, Shapiro-Wilk 检验结果表明: $P=0.126 4>0.05$, 符合连续偏正态分布, 且其敏感性频率分布呈连续单峰曲线(图 3)。因此可以将其作为试验地区腐皮镰孢对咯菌腈的敏感基线。

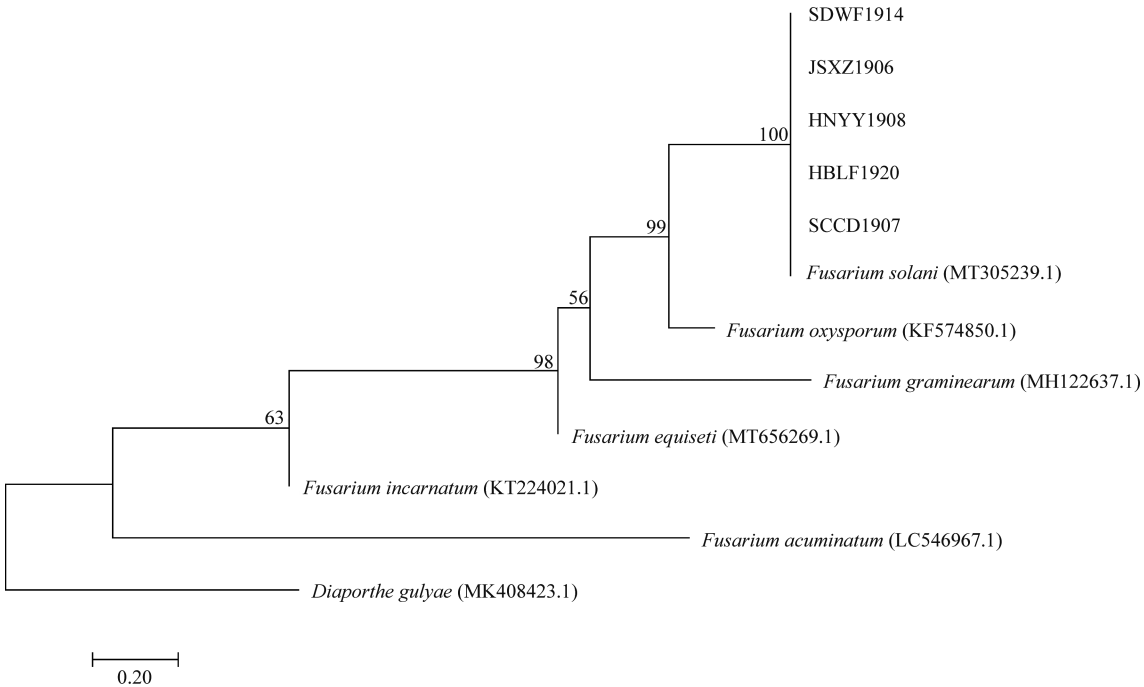


图 2 基于 *EF-1α* 序列的辣椒根腐病病原菌代表菌株的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of representative isolates of pepper root rot pathogens based on *EF-1α* sequences

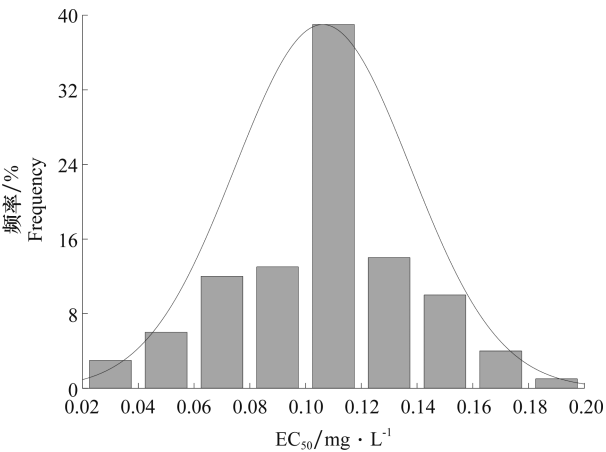


图 3 102 株腐皮镰孢对咯菌腈的敏感性频率分布

Fig. 3 Frequency distribution of the sensitivities of 102 isolates of *Fusarium solani* to fludioxonil

2.3 腐皮镰孢抗咯菌腈突变体的获得

通过药剂驯化对随机选取的 3 个菌株进行 19 代抗药性选育后仅有菌株 SDWF1914 获得 2 个抗咯菌腈突变体: SDWF1914-Y336 和 SDWF1914-Y017,抗性倍数分别为 8.35 和 6.94(表 1),抗性突变频率为 3.51×10^{-4} 。通过紫外诱导对随机选取的 3 个菌株进行 9 次紫外诱变后,SDWF1914 和 JSXZ1906 分别获得 9 个、13 个疑似抗药性突变体,经连续 12 代抗药稳定性测定后,SDWF1914 诱导的

SDWF1914-ZR717 和 JSXZ1906 诱导的 JSXZ1906-ZR496,可以稳定遗传,抗性倍数分别为 9.78 和 32.43(表 1),抗性突变频率为 7.41×10^{-9} 。表明腐皮镰孢亲本菌株经药剂驯化和紫外诱导后产生不同抗性水平的抗咯菌腈突变体。

表 1 抗性突变体及亲本菌株对咯菌腈的敏感性及其抗性水平¹⁾

Table 1 The sensitivity and resistance levels of resistant mutants and parental isolates to fludioxonil		
菌株 Isolate	EC ₅₀ /mg · L ⁻¹	抗性倍数 Resistance ratio
SDWF1914	0.096 8	—
SDWF1914-Y336	0.808 3	8.35
SDWF1914-Y017	0.671 8	6.94
SDWF1914-ZR717	0.946 7	9.78
JSXZ1906	0.101 7	—
JSXZ1906-ZR496	3.298 1	32.43

1) SDWF1914、JSXZ1906 为亲本菌株,其余为咯菌腈抗性突变体。下同。
SDWF1914 and JSXZ1906 are parental isolates, and the others are fludioxonil resistant mutants. The same applies below.

2.4 腐皮镰孢抗咯菌腈突变体的主要生物学性状

2.4.1 抗性遗传稳定性

腐皮镰孢抗咯菌腈突变体及其亲本菌株在无药 PDA 培养基平板上转接 12 代后,抗性突变体对咯

菌腈的抗性倍数均降低(表 2),但变化不明显,抗性水平均未发生改变,说明抗性突变体具有较为稳定的抗性遗传性。

表 2 腐皮镰孢抗咯菌腈突变体的抗性遗传稳定性
Table 2 Resistance stability of the mutants of *Fusarium solani* to fludioxonil

菌株 Isolate	EC ₅₀ /mg · L ⁻¹		抗性倍数 Resistance ratio	
	第 1 代 The 1st generation	第 12 代 The 12th generation	第 1 代 The 1st generation	第 12 代 The 12th generation
SDWF1914	0.096 8	0.094 2	—	—
SDWF1914-Y336	0.808 3	0.734 6	8.35	7.80
SDWF1914-Y017	0.671 8	0.602 0	6.94	6.39
SDWF1914-ZR717	0.946 7	0.701 9	9.78	7.45
JSXZ1906	0.101 7	0.100 8	—	—
JSXZ1906-ZR496	3.298 1	2.085 1	32.43	20.69

2.4.2 适宜生长温度

由表 3 可知:腐皮镰孢抗咯菌腈突变体及其亲本菌株在 15~35℃ 条件下均能生长,同一菌株在不同温度下生长速率不同。在同一温度下,抗性突变体菌丝生长速率略低于其亲本菌株,但差异性不显著。因此,可以认为在不同试验温度下抗性突变体与其亲本菌株的菌丝生长速率差别较小。

表 3 培养温度对腐皮镰孢抗咯菌腈突变体及其亲本菌株菌丝生长的影响¹⁾

Table 3 Effects of culture temperatures on the mycelial growth of fludioxonil-resistant mutants of *Fusarium solani* and their parental isolates

菌株 Isolate	菌丝生长速率±标准误/cm · d ⁻¹ Mycelial growth rate± standard error		
	15℃	25℃	35℃
SDWF1914	0.35±0.01	0.97±0.01	0.78±0.04
SDWF1914-Y336	0.29±0.02	0.89±0.04	0.69±0.04
SDWF1914-Y017	0.33±0.02	0.92±0.03	0.76±0.02
SDWF1914-ZR717	0.30±0.02	0.91±0.03	0.71±0.04
JSXZ1906	0.37±0.03	1.03±0.08	0.82±0.04
JSXZ1906-ZR496	0.32±0.00	0.95±0.05	0.76±0.03
方差分析结果 Analysis of variance	F _{5,10} =1.520 P=0.267 6	F _{5,10} =1.045 P=0.443 4	F _{5,10} =1.422 P=0.296 5

1) SDWF1914、JSXZ1906 为亲本菌株,其余为咯菌腈抗性突变体。同列数据后相同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 0.05 水平差异不显著。下同。
SDWF1914 and JSXZ1906 are parental isolates, and the others are fludioxonil resistant mutants. The same letter in the same column indicate insignificant difference at 0.05 level by Duncan's new multiple range method test. The same applies below.

2.4.3 产孢能力和致病力

产孢能力和致病力测定结果(表 4)表明:抗性突变体产孢量与其亲本菌株无显著差异,说明抗性突变体在 PDA 平板上正常生长时具有与亲本菌株相当的产孢能力。抗性突变体侵染活体辣椒后产生的病斑面积与其亲本菌株不存在显著差异,表明抗性突变体具有类似于亲本菌株的致病能力。

表 4 腐皮镰孢抗咯菌腈突变体及其亲本菌株的产孢能力和致病力

Table 4 Sporulation and pathogenicity of fludioxonil-resistant mutants and their parental isolates of *Fusarium solani*

菌株 Isolate	产孢量±标准误/ ×10 ⁶ 个 · mL ⁻¹ Sporulation± standard error	病斑面积± 标准误/cm ² Lesion area± standard error
SDWF1914	9.22±0.04	2.36±0.08
SDWF1914-Y336	8.99±0.09	2.17±0.10
SDWF1914-Y017	9.15±0.08	2.33±0.05
SDWF1914-ZR717	9.33±0.13	2.40±0.07
JSXZ1906	9.26±0.07	2.35±0.02
JSXZ1906-ZR496	9.28±0.16	2.28±0.09
方差分析结果 Analysis of variance	F _{5,10} =1.112 P=0.412 9	F _{5,10} =0.946 P=0.492 5

2.4.4 对咯菌腈与其他杀菌剂的交互抗性

供试药剂的 EC₅₀(表 5)测定结果表明:腐皮镰孢抗咯菌腈突变体及其亲本菌株对 4 种杀菌剂的敏感性由高到低依次为多菌灵>啞菌酯>醚菌酯>福美双。交互抗性测定(表 6)结果显示:咯菌腈 EC₅₀ 对数值与 4 种杀菌剂 EC₅₀ 对数值之间的相关系数分别为 0.005 9、0.387 7、0.148 2、0.453 8, P>0.05, 表明腐皮镰孢对咯菌腈与啞菌酯、醚菌酯、多菌灵、福美双之间不存在交互抗性。

表 5 腐皮镰孢抗咯菌腈突变体及其亲本菌株对不同杀菌剂的敏感性

Table 5 Sensitivity of fludioxonil-resistant mutants of *Fusarium solani* and their parental isolates to different fungicides

菌株 Isolate	EC ₅₀ /mg · L ⁻¹			
	啞菌酯 azoxys- trobin	醚菌酯 kresoxim- methyl	多菌灵 carben- dazim	福美双 thiram
SDWF1914	2.184 6	2.136 8	0.652 1	24.372 5
SDWF1914-Y336	3.089 4	3.113 7	0.539 4	24.859 3
SDWF1914-Y017	2.174 4	3.156 3	0.667 2	27.467 4
SDWF1914-ZR717	3.142 9	2.848 9	0.700 4	25.194 6
JSXZ1906	2.853 6	2.742 5	0.624 9	27.348 9
JSXZ1906-ZR496	2.221 7	2.535 5	0.610 7	29.312 8

表 6 腐皮镰孢对咯菌腈及其他 4 种杀菌剂的交互抗性¹⁾

Table 6 Cross-resistance of *Fusarium solani* to fludioxonil and the other four fungicides

药剂 Fungicide	回归方程 Regression equation	<i>r</i>	<i>P</i>
啞菌酯 azoxystrobin	$y = -0.000\ 8x + 0.945\ 8$	0.005 9	0.991 1
醚菌酯 kresoxim-methyl	$y = 0.040\ 9x + 1.033\ 0$	0.387 7	0.447 6
多菌灵 carbendazim	$y = -0.009\ 7x - 0.468\ 1$	0.148 2	0.779 3
福美双 thiram	$y = 0.023\ 7x + 3.288\ 3$	0.453 8	0.366 1

1) *x* 为腐皮镰孢对咯菌腈的 EC₅₀ 对数值, *y* 为同一腐皮镰孢菌株对应于上述其中 1 种杀菌剂的 EC₅₀ 对数值。
x is the logarithm of EC₅₀ value of *F. solani* to fludioxonil, and *y* is the logarithm of EC₅₀ value of the same isolate to the one of the above-mentioned fungicides.

3 结论与讨论

镰孢属分布广泛,属内不仅种类繁多,并且种间差异微小,仅凭菌丝、孢子的形状、大小等传统形态特征鉴定方法很难准确区分种类^[23-25],rDNA-ITS、*EF-1α* 延伸因子等主效位点基因序列分析可为镰孢菌种、亚种等级的分类鉴定提供依据^[26]。因此本研究采用 ITS 和 *EF-1α* 基因序列进行分子鉴定,构建系统发育树,明确采集、分离菌株为腐皮镰孢 *F. solani*。目前国内登记的苯基吡咯类杀菌剂仅有咯菌腈,其作用机制可能为抑制葡萄糖磷酸化有关的转移进而抑制菌丝生长^[27];另有研究表明,咯菌腈在菌体内作用靶标是Ⅲ型组氨酸激酶,咯菌腈可导致病原菌 HOG-MAPK 途径持续激活,合成并积累大量甘油,从而导致病原菌死亡^[28-29]。已有研究表明,2%咯菌腈颗粒剂对于田间辣椒根腐病具有较好的防治作用,有效成分用量为 150 g/hm² 时防效可达 84.85%^[30]。但目前关于腐皮镰孢对咯菌腈的敏感性分布以及腐皮镰孢抗咯菌腈突变体的获得及其生物学性状尚未见报道。因此,本研究采用菌丝生长速率法测定了供试地区 102 株腐皮镰孢对咯菌腈的敏感性,发现供试菌株对咯菌腈具有较高的敏感性,其 EC₅₀ 分布范围为 0.029 0~0.183 4 mg/L,平均 EC₅₀ 为(0.106 2±0.031 5)mg/L,敏感性频率分布为连续单峰曲线,所以可将其作为供试地区腐皮镰孢对咯菌腈的敏感基线。

杀菌剂抗性行动委员会(FRAC)评定苯基吡咯类杀菌剂固有抗药性风险为低至中等,有关该类杀

菌剂的抗性亦有报道:弥勒市采集到对咯菌腈产生低抗药性的葡萄灰霉病菌菌株^[31],四川省部分地区的草莓灰霉病菌已对咯菌腈产生抗性^[32]。目前对咯菌腈产生抗性的田间镰孢属真菌鲜有发现。本研究通过药剂驯化获得 2 株腐皮镰孢抗咯菌腈突变体,紫外诱导获得多个抗咯菌腈突变体,但仅有 2 株耐药性可稳定遗传。杀菌剂抗性行动委员会(FRAC)评定镰孢属 *Fusarium* spp. 病原菌固有抗药性风险为低等,结合咯菌腈固有抗药性风险以及农事操作抗药性风险,将腐皮镰孢对咯菌腈的室内抗药性风险等级评估为低至中等。本研究中腐皮镰孢抗咯菌腈突变体获得频率较低,评估结果亦得到佐证。腐皮镰孢抗咯菌腈突变体生物学性状与亲本敏感菌株相差较小。这与贾娇等^[33]报道禾谷镰孢抗咯菌腈突变体对温度、pH 等敏感性与亲本菌株相似的结论一致。但灰葡萄孢高抗咯菌腈突变体与敏感菌株在生物学特性方面存在显著差异^[34]。推测造成差异的可能原因有:病原菌本身种间特性不同以及抗性突变体的抗性水平不等所造成。桑程巍^[35]认为并非所有抗性菌株生物学特征都相似,王秋月等^[36]认为不同的驯化或诱导方法以及不同地区菌株遗传背景的差异会导致抗性突变体与其亲本菌株部分生物学性状出现差异。二者的观点都为上述推测提供了理论依据。

管磊等^[37]报道咯菌腈对引起花生根腐病的腐皮镰孢 *F. solani* 具有较高的室内毒力,本研究表明供试 102 株腐皮镰孢对咯菌腈具有较高的敏感性,与此研究结果一致。由于咯菌腈作用机制特殊,国内尚未有登记的同类药剂防治田间辣椒病害,因此交互抗性研究中选用目前已登记防治辣椒根腐病的多菌灵和福美双,以及甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂啞菌酯和醚菌酯作为供试药剂,结果表明腐皮镰孢对咯菌腈与供试药剂之间均无交互抗性。前人^[16,38]研究也发现,镰孢属小麦赤霉病菌 *F. graminearum* 对咯菌腈的敏感性与其对多菌灵、戊唑醇的敏感性之间无明显相关性;藤仓镰孢 *F. fujikuroi* 对咯菌腈与咪鲜胺和戊唑醇之间不存在交互抗性。因此建议咯菌腈在防治辣椒根腐病时可与不同作用机制的杀菌剂混用或交替使用,从而保证防治效果并减缓抗药性的发生。韩絮^[39]研究发现,玉米小斑病菌 *Bipolaris maydis* 对咯菌腈产生抗药性与Ⅲ型

双组分组氨酸激酶的突变相关。相对本研究中的抗性突变体而言,抗性的产生是否与上述突变相关还有待研究。由于本研究所获得的抗性突变体是在室内条件下产生的,在田间腐皮镰孢能否产生抗咯菌腈突变体以及抗性突变体的生物学性状与室内获得的突变体的生物学性状是否会不同,还需要进一步验证。

参考文献

- [1] JABER L R, ALANANBEH K M. Fungal entomopathogens as endophytes reduce several species of *Fusarium* causing crown and root rot in sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) [J]. *Biological Control*, 2018, 126: 117–126.
- [2] 马骁. 棚栽辣椒根腐病发生与综合防控[J]. *西北园艺(综合)*, 2020(1): 42–43.
- [3] 黄金花, 邱传明. 茂名辣椒种植的主要病害及防治[J]. *农业技术与装备*, 2020(6): 146–147.
- [4] 殷福芝. 辣椒根腐病的症状识别与综合防治[J]. *上海蔬菜*, 2019(5): 55.
- [5] 贾晨波, 郭洋, 马成莲, 等. 宁杞1号枸杞健康株与根腐病患株的土壤微生物群落和功能差异[J]. *生态环境学报*, 2021, 30(9): 1831–1841.
- [6] 苗翠苹. 三七根际土壤微生物的群落特征[D]. 昆明: 云南大学, 2015.
- [7] CAO Yun, CHANG Zhizhou, WANG Jidong, et al. Potential use of anaerobically digested manure slurry to suppress *Phytophthora* root rot of chilli pepper [J]. *Scientia Horticulturae*, 2014, 168(26): 124–131.
- [8] SUN Ruibo, ZHANG Xuexian, GUO Xisheng, et al. Bacterial diversity in soils subjected to long-term chemical fertilization can be more stably maintained with the addition of livestock manure than wheat straw [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2015, 88: 9–18.
- [9] 贲秀兰, 赵海红, 苏兴海. 小麦赤霉病不同药剂试验简报[J]. *上海农业科技*, 2012(6): 128–129.
- [10] 刘佳. 25%多福克不同配比对绿豆根腐病菌联合毒力的测定[J]. *安徽农学通报*, 2011, 17(9): 134–135.
- [11] 闫潇敏, 宁斌科, 王列平, 等. 新型杀菌剂氟咯菌腈及其研究开发进展[J]. *世界农药*, 2010, 32(3): 36–38.
- [12] AMIRI A, MULVANEY K A, PANDIT L K. First report of *Penicillium expansum* isolates with low levels of resistance to fludioxonil from commercial apple packinghouses in Washington State [J]. *Plant Disease*, 2017, 101(5): 835.
- [13] 杨亚兰. 灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)中与咯菌腈作用机理相关基因 *BcSln1* 和 *BcSho1* 的生物学功能研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2017.
- [14] 娄天成, 左杨, 张心宁, 等. 杀菌剂咯菌腈对根腐病的室内毒力测定和田间防治效果[J]. *江苏农业科学*, 2021, 49(11): 80–84.
- [15] 潘龙其, 张丽, 袁庆华, 等. 不同杀菌剂对拟枝孢镰刀菌的毒力测定及田间防效[J]. *中国农业大学学报*, 2016, 21(1): 87–96.
- [16] 刘禹含, 邹佳营, 何博, 等. 吉林省水稻恶苗病菌对咯菌腈的敏感性及其抗性风险评估[J/OL]. *吉林农业大学学报*. (2020–09–16) [2021–10–11]. <https://doi.org/10.13327/j.jjla.2020.5228>.
- [17] 纪军建, 张小凤, 王文桥. 番茄灰霉病菌对咯菌腈的抗性诱变及抗药突变体的生物学特性[J]. *农药学报*, 2012, 14(5): 497–502.
- [18] 赵卫松, 韩秀英, 齐永志, 等. 辣椒疫霉对双链酰胺菌的敏感性测定及其抗药突变体生物学性状研究[J]. *农药学报*, 2011, 13(1): 21–27.
- [19] LU Xiaohong, HAUSBECK M K, LIU Xili, et al. Wild type sensitivity and mutation analysis for resistance risk to fluopicolide in *Phytophthora capsici* [J]. *Plant Disease*, 2011, 95(12): 1535–1541.
- [20] BRUIN G C A, EDGINGTON L V. Induction of fungal resistance to metalaxyl by ultraviolet irradiation [J]. *Phytopathology*, 1982, 72(5): 476–480.
- [21] LU Xiaohong, ZHU Shusheng, BI Yang, et al. Baseline sensitivity and resistance-risk assessment of *Phytophthora capsici* to iprovalicarb [J]. *Phytopathology*, 2010, 100(11): 1162–1168.
- [22] ZHOU Yuxin, CHEN Lei, HU Jian, et al. Baseline sensitivity of natural population and resistance risk of *Peronophythora litchii* to four novel QoI fungicides [J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2016, 146: 71–83.
- [23] 朱孟峰, 吴伟怀, 贺春萍, 等. 咖啡腐皮镰孢黑果病原鉴定及其生物学特性测定[J]. *热带作物学报*, 2021, 42(3): 822–829.
- [24] SUMMERELL B A, SALLEH B, LESLIE J F. A utilitarian approach to *Fusarium* identification [J]. *Plant Disease*, 2003, 87(2): 117–128.
- [25] 吕国忠, 赵志慧, 孙晓东, 等. 串珠镰孢菌种名的废弃及其与腾仓赤霉复合种的关系[J]. *菌物学报*, 2010, 29(1): 143–151.
- [26] 柳凤, 詹儒林, 韦继光, 等. 现代生物技术在镰刀菌分类学中的应用[J]. *中国农学通报*, 2012, 28(30): 166–170.
- [27] 刘长令. 农用杀菌剂开发的新进展[J]. *农药科学与管理*, 2000(3): 20–26.
- [28] HAGIWARA D, MATSUBAYASHI Y, MARUI J, et al. Characterization of the NikA histidine kinase implicated in the phosphorelay signal transduction of *Aspergillus nidulans*, with special reference to fungicide responses [J]. *Bioscience Biochemistry & Biochemistry*, 2007, 71(3): 844–847.

- [5] SULEHRIE M A Q. An investigation into different responses of a Pakistani biotype of *Callosobruchus maculatus* (Bruchidae: Coleoptera) to four new varieties of pulses from Pakistan [D]. London: University of Greenwich, 2000.
- [6] 单常尧, 曹阳, 姜彬, 等. 糙米与被锈赤扁谷盗侵染糙米挥发性化合物对比分析[J]. 食品科技, 2020, 45(11): 275–283.
- [7] 王效国, 宋瑞成. 浅谈锈赤扁谷盗的习性与防治[J]. 中国粮食经济, 2009(7): 40–41.
- [8] 郝广凯, 曾伶, 劳传忠, 等. 温度对锈赤扁谷盗生长发育及种群变动的影响[J]. 粮食储藏, 2015, 44(1): 1–5.
- [9] 张永科, 朱国渊, 龙继明, 等. 赤斑白条天牛卵发育历期和有效积温研究[J]. 中国森林病虫, 2021, 40(6): 15–17.
- [10] 源丽枫. 锈赤扁谷盗种群生态控制技术[D]. 广州: 华南农业大学, 2016.
- [11] NASERI B, BORZOU E. Life cycle and digestive physiology of *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae) on various wheat cultivars [J]. Annals of the Entomological Society of America, 2016, 109(6): 831–838.
- [12] FARDISI M, MASON L J, ILELEJI K E, et al. Effect of chemical and physical properties of dried distillers grains with solubles (DDGS) on *Tribolium castaneum* (Herbst) development [J]. Journal of Stored Products Research, 2019, 80: 57–64.
- [13] ARTHUR F H, HALE B A, STARKUS L A, et al. Development of *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae) on rice milling components and by-products: Effects of diet and temperature [J]. Journal of Stored Products Research, 2019, 80: 85–92.
- [14] 李得宇, 艾鹏鹏, 王军, 等. 不同寄主植物对桃蛀螟种群生长发育和繁殖的影响[C]//吴孔明. 创新驱动与现代植保——中国植物保护学会第十一次全国会员代表大会暨 2013 年学术年会论文集. 北京: 中国农业科技出版社, 2013.
- [15] 龙莹, 刘建萍, 伍绍龙, 等. 不同品种烟草对斜纹夜蛾幼虫生长和营养利用效率的影响[J]. 中国烟草学报, 2020, 26(3): 91–96.
- [16] 袁伊旻, 张雨桐, 孙静, 等. 不同寄主植物对南亚果实蝇发育的影响研究[J]. 农业与技术, 2021, 41(15): 23–26.
- [17] BORZOU E, NASERI B, NOURI-GANBALANI G. Effects of food quality on biology and physiological traits of *Sitotroga cerealella* (Lepidoptera: Gelechiidae) [J]. Journal of Economic Entomology, 2016, 110(1): 266–273.
- [18] 蒋丰泽, 郑灵燕, 郭技星, 等. 温度对昆虫繁殖力的影响及其生理生化机制[J]. 环境昆虫学报, 2015, 37(3): 653–663.
- [19] 何莉梅, 葛世帅, 陈玉超, 等. 草地贪夜蛾的发育起点温度、有效积温和发育历期预测模型[J]. 植物保护, 2019, 45(5): 18–26.
- [20] 张树怀, 夏秀清, 苏红田, 等. 光肩星天牛发育起点温度和有效积温的研究[J]. 内蒙古农牧学院学报, 1995, 16(2): 45–49.
- [21] 李向永, 尹艳琼, 赵雪晴, 等. 云南不同菜区小菜蛾的产卵规律与发育起点温度[J]. 应用昆虫学报, 2011, 48(2): 254–259.
- [22] 吴孔明, 郭予元. 营养对棉铃虫发育积温的影响[J]. 植物保护, 1994, 20(4): 16–17.
- [23] 陈元生, 罗致迪, 钟平华. 棉铃虫发育起点温度和有效积温的地理变异[J]. 环境昆虫学报, 2017, 39(3): 573–579.
- [24] 刘婷, 金道超, 郭建军, 等. 腐食酪螨在不同温度和营养条件下生长发育的比较研究[J]. 昆虫学报, 2006, 49(4): 714–718.
- [25] 王明洁, 蔡婷婷, 鞠兴荣, 等. 不同氮气浓度、温度条件下锈赤扁谷盗未成熟阶段各虫态的发育[J]. 粮食储藏, 2015, 44(2): 1–6.

(责任编辑: 杨明丽)

(上接 120 页)

- [29] MOTOYAMA T, OHIRA T, KADOKURA K, et al. An Os-1 family histidine kinase from a filamentous fungus confers fungicide-sensitivity to yeast [J]. Current Genetics, 2005, 47(5): 298–306.
- [30] 张学江, 常威, 陈婷婷, 等. 1.5%啞菌酯·咯菌腈颗粒剂防治辣椒根腐田间药效试验[J]. 现代农业科技, 2020(23): 81–82.
- [31] 普继雄, 周宗山, 王娜, 等. 弥勒市葡萄灰霉病菌对 4 种杀菌剂的抗药性检测[J]. 果树学报, 2021, 38(7): 1147–1152.
- [32] 贡常委, 秦旻旻, 屈劲松, 等. 四川省草莓灰霉病菌对咯菌腈的抗性测定及其机制[J]. 中国农业科学, 2018, 51(22): 4277–4287.
- [33] 贾娇, 苏前富, 孟玲敏, 等. 抗咯菌腈禾谷镰刀菌的紫外诱导及其生物学特性[J]. 植物保护, 2016, 42(4): 43–47.
- [34] 李亚萌. 北京地区番茄灰霉病菌对咯菌腈的抗性风险评估[D]. 北京: 北京农学院, 2020.
- [35] 桑程巍. 设施栽培草莓灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)对咯菌腈抗药性检测及其生物学性质[D]. 南京: 南京农业大学, 2018.
- [36] 王秋月, 马冠华, 尹学伟, 等. 重庆地区辣椒疫霉对氟吡菌胺的敏感性及其抗性突变体的生物学性状[J]. 农药学报, 2019, 21(2): 165–174.
- [37] 管磊, 郭贝贝, 王晓坤, 等. 苯醚甲环唑等杀菌剂包衣种子防治花生冠腐病和根腐病[J]. 植物保护学报, 2016, 43(5): 842–849.
- [38] 徐建强, 平忠良, 马世闯, 等. 河南省小麦赤霉病菌对咯菌腈的敏感性[J]. 植物保护学报, 2018, 45(6): 1367–1373.
- [39] 韩絮. 玉米小斑病菌(*Bipolaris maydis*)对苯基吡咯类杀菌剂咯菌腈潜在抗药性风险评估[D]. 南京: 南京农业大学, 2017.

(责任编辑: 杨明丽)