



华夏英才基金学术文库

杨 谦 著

植物病原菌抗药性 分子生物学



科学出版社

www.sciencep.com



华夏英才基金学术文库

植物病原菌抗药性 分子生物学

杨 谦 著

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书从植物病原菌对杀菌剂抗药性的基本概念、抗药性形成与发展的分子生物学、抗药性机制的分子生物学、抗药性治理的分子生物学原理、抗药性利用的分子生物学、抗药性的研究方法等方面进行了较为全面和系统的论述。其中,为了满足进行植物病原菌对杀菌剂抗药性研究、揭示抗药性分子生物学本质的需要,作者针对在植物病原菌抗药性形成与发展的分子生物学领域里存在的争论,提出了新的观点;在如何对待抗药性问题方面,作者从微生物基因工程的角度,在抗药性机制的分子生物学、抗药性治理的基因工程、抗药性研究的分子生物学方法等方面进行了探讨。

本书理论性较强,涉及许多交叉研究领域,内容丰富,思维科学,观点新颖,同时,又有较强的实践指导意义。可供从事植物病原菌对杀菌剂抗药性方面学习研究的大学生、研究生以及教学科研人员阅读,也可以为生产实践中科学治理抗药性问题提供丰富的资料和重要的指导。

图书在版编目(CIP)数据

植物病原菌抗药性分子生物学/杨谦著. —北京:科学出版社,2003.9

(华夏英才基金学术文库)

ISBN 7-03-011470-1

I. 植… II. 杨… III. 植物-病原细菌-抗药性-分子生物学
IV. S481

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2003)第 040827 号

责任编辑:莫结胜/责任校对:林青梅

责任印制:刘士平/封面设计:黄华斌 陈 敬

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

源海印刷有限责任公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2003年9月第 一 版 开本:B5(720×1000)

2003年9月第一次印刷 印张:10 1/2

印数:1—2000 字数:209 000

定价: 25.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈新欣〉)

Summary

This book covers the definitions, developmental molecular biology, mechanism of molecular biology and management with genetic engineering technique of the resistance of plant pathogen to fungicides. In these aspects above, in order to meet the need of the research and study on the resistance and the work on the utilization and research methods of the resistance, it does not only describe the definitions of the resistance of plant pathogen accurately but also discuss the molecular biology of the utilization of the resistance creatively.

This book is theoretical, including several areas acrossed together and involving some fresh thinking. At the same time, the study on the management of the resistance in this book is also quite practical. Therefore, it is helpful to the students, researchers and practical workers who are working on the resistance.

前 言

植物病原菌的抗药性是植物病害化学防治中的一个严重问题。它给多种植物病害,包括果树、蔬菜、农作物、经济作物等的病害防治带来了困难。由于抗药性引起的防治效果下降甚至完全失效而造成的经济损失很大。因此,如何有效地解决植物病原菌的抗药性问题,保证植物病害化学防治的效果,是世界各国植物病理学界和农药学界普遍关注的问题。

四十多年来,国内外同行已经对植物病原菌的抗药性的出现及其原因,对抗药性的机制和对抗药性的治理策略进行了广泛的研究,研究的深度已经达到分子生物学水平,为我们在这一领域内继续探索提供了丰富的资料。作者在这方面的研究,特别是在微生物基因工程领域,取得了令人瞩目的成果。这些对进一步揭示植物病原菌抗药性的内在规律,特别是在分子生物学水平认识抗药性现象,发展遗传学理论具有重要意义。因此,作者根据多年来自己在植物病原菌的抗药性分子生物学方面的研究结果和前人留下来的大量资料撰写了《植物病原菌抗药性分子生物学》,目的在于把植物病原菌的抗药性方面的研究新成果加以归纳、分析,使之系统化,指出植物病原菌的抗药性研究中一些基本问题的争论所在,通过客观的实验和科学的思维提出符合实际的观点,冲破传统理论中不符合客观实际部分的束缚,发展现有理论,为从事植物病原菌的抗药性工作的同事们提供力所能及的方便和帮助。

本书对植物病原菌抗药性的基本概念、形成发展的分子生物学、抗药性机制的分子生物学、抗药性治理的基因工程方法、应用潜力和研究的生物工程方法等方面进行了比较系统的论述。是国内全面、系统论述植物病原菌抗药性分子生物学的第一本专著。

在本书准备和撰写的过程中,得到了 M. A. de Waard 博士、R. T. V. Fox 博士、H. Ishii 博士、叶钟音教授、于久才教授、周明国教授、Kasem 博士、Hollomon 博士等国内外专家及同行们的多方面帮助和支持,在此深表谢意。

由于本书涉及的内容比较广泛,加之作者的水平有限,书中难免会有一些缺点错误,欢迎各位读者批评指正。谢谢!

杨 谦

2003 年 8 月于哈尔滨

目 录

前言

引言	1
第一章 植物病原菌的抗药性	3
第一节 植物病原菌抗药性的概念	3
第二节 植物病原菌对不同杀菌剂的抗药性	4
一、不同植物病原菌对多菌灵的抗药性	5
二、不同植物病原菌对噻菌灵的抗药性	11
三、不同植物病原菌对苯来特的抗药性	12
四、植物病原菌对甲基托布津的抗药性	15
五、不同植物病原菌对代森锰锌的抗药性	16
六、不同植物病原菌对福美双的抗药性	17
七、不同植物病原菌对有机磷杀菌剂的抗药性	19
八、不同植物病原菌对甾醇合成抑制剂的抗药性	21
九、不同植物病原菌对二甲酰亚胺类杀菌剂的抗药性	22
十、不同植物病原菌对乙酰基丙氨酸类杀菌剂的抗药性	23
十一、植物病原菌对抗菌素类杀菌剂的抗药性	25
第三节 植物病原菌对杀菌剂的正负交互抗药性	26
一、不同植物病原菌对杀菌剂的交互抗药性	26
二、不同植物病原菌对杀菌剂的负交互抗药性	31
第四节 植物病原菌抗药性的主要类型	33
第二章 抗药性形成与发展的分子生物学	36
第一节 杀菌剂作用机制的分子生物学	36
一、苯并咪唑类杀菌剂对病原菌的作用机制	36
二、二甲酰亚胺类杀菌剂对病原菌的作用机制	40
三、硫代磷酸酯类杀菌剂对病原菌的作用机制	41
四、磷酰胺类杀菌剂对病原菌的作用机制	41
五、乙磷铝对病原菌的作用机制	42
六、甾醇合成抑制剂对病原菌的作用机制	43
七、抗菌素类杀菌剂对病原菌的作用机制	45
第二节 杀菌剂与病原菌代谢活动的关系	47

一、杀菌剂对病原菌物质代谢的影响	47
二、杀菌剂对病原菌能量代谢的影响	51
三、杀菌剂对病原菌信息代谢的影响	57
第三节 抗药性形成发展的分子生物学	57
第四节 抗药性形成与发展的影响因素	60
一、药剂种类及其作用机制	60
二、病害种类	62
三、抗性突变体出现的频率及其对环境的适应性	62
四、药剂的使用技术和方法	63
第三章 抗药性机制的分子生物学	64
第一节 抗药性生理机制的分子生物学	64
一、抗药性生理机制的主要类型	64
二、不同病原菌对杀菌剂的抗性机制	66
第二节 抗药性遗传机制的分子生物学	70
一、病原菌对杀菌剂抗药性遗传机制的研究概况	71
二、不同病原菌对杀菌剂抗药性的具体遗传机制	75
第四章 抗药性治理及其分子生物学原理	82
第一节 抗药性发展状况的监测	82
一、对抗药性发展状况进行监测的主要内容	82
二、对不同病原菌进行抗药性监测的具体方法	84
第二节 抗药性治理及其分子生物学原理	96
一、病害的预测预报和综合防治	96
二、改进杀菌剂的施用方法	97
三、抗药性治理的分子生物学原理	100
第三节 抗药性治理的实践	101
一、治理葡萄灰霉病菌对多菌灵和二甲酰亚胺类等杀菌剂抗药性的方法	101
二、治理草莓灰霉病菌对多菌灵抗药性的方法	102
三、治理水稻恶苗病菌对多菌灵抗药性的方法	102
四、治理稻瘟病菌对有机磷类杀菌剂抗药性的方法	102
五、治理梨黑星病菌和苹果黑星病菌对苯并咪唑类杀菌剂抗药性的方法	103
六、治理梨黑星病菌(<i>V. nashicola</i>)和苹果黑星病菌对 DMI 杀菌剂抗药性的方法	103
七、治理梨黑斑病菌对多抗霉素抗药性的方法	103
第五章 抗药性利用的分子生物学	105

第一节 抗药性利用的可能性	105
第二节 负交互抗药性的利用	106
一、在防治灰霉病菌苯并咪唑抗性菌中的应用	106
二、在防治梨黑星病菌苯并咪唑抗性菌中的应用	106
三、在防治水稻恶苗病菌等病菌苯并咪唑抗性菌中的应用	109
第三节 对抗药性基因利用的分子生物学	109
一、在害虫综合防治中对病原菌抗药性基因的利用	109
二、在病害综合防治中对病原菌抗药性基因利用的尝试	111
三、对利用植物病原菌抗药性基因前景的展望	117
第六章 抗药性的研究方法	118
第一节 杀菌剂毒力的生物测定	118
一、离体测定法	119
二、活体测定法	120
三、离体与活体相结合的生物测定技术	120
第二节 研究抗药性的生物化学方法	121
一、放射性同位素标记构巢曲霉蛋白质的方法	122
二、构巢曲霉微管蛋白与猪脑微管蛋白的共聚合方法	122
三、蛋白质双向电泳样品的准备	123
四、电泳技术	123
五、多肽图的测绘	124
第三节 抗药性研究中的分子生物学方法	124
一、基因工程技术的概况	124
二、基因工程的主要过程	125
三、抗药性基因工程研究方法	141
参考文献	143
索引	149
一、中文索引	149
二、英文索引	153

引言

21 世纪是以生物技术等高新技术为先导的科学技术飞速发展的崭新时代。在生物科学领域,随着分子生物学的诞生和发展,人类认识生命现象、揭示生命奥秘的水平又达到了一个新的高度。抗药性问题是化学保护科学发展所面临的严重挑战之一。它直接影响着化学农药在病虫害管理体系中的防治效果。运用分子生物学方法研究抗药性问题对于揭示抗药性的本质具有重要意义。

随着人民生活水平的提高,水果、蔬菜等经济作物的生产有了飞速发展,从而推动了对果树、蔬菜等经济作物病害化学防治工作的开展。由于杀菌剂,特别是内吸性杀菌剂使用量的迅速增加,植物病原菌对杀菌剂的抗药性问题日趋严重。

植物病原菌对杀菌剂的抗药性是指本来对药剂敏感的植物病原菌,由于突变或其他原因出现了敏感性下降的现象。虽然在 20 世纪 50 年代中期已经有人提出这一问题,但是真正在生产上造成巨大损失,从而引起人们的重视是从 60 年代末开始的。1969 年,由于内吸性杀菌剂苯并咪唑类的苯来特在生产上广泛、大量的使用,首先在黄瓜白粉病原菌上产生了抗药性,随后又在几十种病原菌上产生了抗药性。例如:应用苯来特连续防治花生叶斑病两年以后,抗性菌株可耐浓度比敏感菌株高出 10 倍;在防治玫瑰白粉病时,连续使用 10 个月以后,完全失去防治效果;在防治苹果疮痂病时,应用 3 年以后,其用药浓度提高了 2000 倍;葡萄灰霉病抗性菌的耐药力比无抗性菌系也可高出 2000 倍。此外,植物病原菌对苯来特的类似化合物——甲基托布津也出现了抗药性。

由于内吸性杀菌剂抗药性问题的迅速出现和发展,给植物病害的防治带来了愈来愈大的困难。例如:1972 年在希腊应用苯来特大面积(约 12 150 公顷)防治甜菜褐斑病失败;1976 年在美国应用苯来特防治草莓灰霉病失败;1980 年在荷兰应用瑞毒霉防治马铃薯晚疫病失败等。

杀菌剂抗药性问题的日益严重,引起了世界各国植物病理学界和农药学界的普遍关注。这大大地推动了关于杀菌剂抗药性问题的研究。人们首先认识到了对杀菌剂抗药性状况进行监测的必要。世界各国都在建立和完善他们对杀菌剂抗药性状况的监测网,以保证及时发现苗头,及时进行解决。1981 年在英国吉勒特海尔(Jealott Hill)还召开了杀菌剂抗性对策委员会(Fungicide Resistance Action Committee, FRAC)的正式会议,讨论如何共同协作制定和实施防止或延缓抗药性产生的对策,从而延长杀菌剂的使用寿命。在这方面,世界上各大农药生产公司都倾注了很大的财力。

然而,长期以来在植物病原菌抗药性问题的研究中,对一些基本问题的认识还比较混乱,并且存在着不同的观点。例如:对植物病原菌抗药性的基本概念尚无准确的定义;对抗药性的形成和杀菌剂在这一形成过程中的作用还有争论。这些对该领域研究的顺利开展、对揭示抗药性的本质都有程度不同的阻碍作用,亟待加以解决。

为了有效地防止或延缓对杀菌剂抗药性的产生,人们还进一步对植物病原菌对杀菌剂抗药性产生的原因和抗性机制进行了大量研究。这方面研究进展一方面深化了人们对杀菌剂抗药性问题的认识;另一方面为制定防止或延缓抗药性产生的对策提供了重要的理论依据。国外关于植物病原菌对杀菌剂抗性机制的研究,正在不断深入开展。特别是由于遗传工程学的迅速发展^[1],对于病原菌对内吸性杀菌剂,如多菌灵的抗性机制的研究已经开始运用基因工程技术等先进手段,深入到基因水平^[2,3,4,5,6,7,8]。英国里丁大学(Reading University)Fox 博士等人利用灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)对多菌灵抗药性的遗传机理,通过遗传工程手段,快速预测抗药性的出现,已经取得了成功^[9]。

我国关于植物病原菌对杀菌剂抗药性的研究,还主要在监测方面进行。关于抗性遗传机制方面的研究还很少^[10,11,12,13]。

关于病原菌对内吸性杀菌剂的抗性机制的研究,在国外虽然已经深入到基因水平,但如何在这方面理论研究成果的基础上,进一步研究限制和避免抗药性产生、促进植物病害化学防治发展的途径和方法,尚无令人满意的进展。特别是绝大多数研究者都把注意力仅仅集中在抗药性的有害一面,忽视了抗药性可能被利用一面。例如,在病害的综合防治中,往往需要化学防治和生物防治并用。而杀菌剂又往往对生物防治因子(植物病原菌的寄生菌)也具有杀死作用,从而严重影响了生物防治的效果。如何解决这个矛盾呢?如果从另一个角度来看待抗药性这一自然现象,正如在害虫的防治中已经出现的那样^[14],在弄清植物病原菌对杀菌剂的抗性机制的基础上,争取把对抗杀菌剂的抗药性基因应用于植物病原菌的病原微生物中,通过在研究方法上进行探索,很可能大大地拓宽植物病原菌对杀菌剂抗性及其遗传机制的研究领域。

根据作者多年来在此方面的研究结果,运用分子生物学方法改造生物防治菌,解决生物防治菌的化学杀菌剂敏感的问题,是行之有效的。到目前为止,作者已经在国内外率先将对苯并咪唑类杀菌剂的抗性基因转入木霉菌和毛壳菌,获得了稳定表达该抗药性基因的转化子^[15,16]。

下面将根据作者和国内外同行们在这方面的研究进展,从杀菌剂抗药性的概念、抗药性形成、抗药性机制的分子生物学,抗药性治理应用的基因工程方法等方面进行论述。

第一章 植物病原菌的抗药性

到目前为止,用于防治植物病原菌的杀菌剂种类已经很多。主要类型有无机杀菌剂(如波尔多液),有机硫杀菌剂(如代森类和福美类杀菌剂),有机砷杀菌剂(如田安),内吸性杀菌剂(如多菌灵)和抗菌素类杀菌剂(如井冈霉素)等。在这些杀菌剂中,与抗药性问题关系密切的有有机硫杀菌剂、内吸性杀菌剂和抗菌素类杀菌剂,特别是内吸性杀菌剂的抗药性问题最为严重。

第一节 植物病原菌抗药性的概念

植物病原菌抗药性(resistance of plant pathogen to fungicide)的概念比较混乱。例如,“抗药性”、“耐药性”、“不敏感性”,都常常被用来表示植物病原菌抗药性。但是随着对植物病原菌抗药性问题研究的深入,上述三种被看作是同义语的说法往往会造成一些不必要的混乱。例如:在不同的病原菌中使用同一种杀菌剂,不同的病原菌常常表现出不同的敏感性;在同一病原菌不同的生长时期使用同一种杀菌剂,其敏感性也可能不同。那么,这些情况是“抗药性”、“耐药性”、还是“不敏感性”呢?为了避免这类混乱,我们对植物病原菌抗药性做如下定义。

首先,是植物病原菌的**耐药性(tolerance)**。它是指植物病原菌的自然属性,是由于植物病原菌菌种的不同,或同一种植物病原菌但生长时期不同、生理状态不同、生长环境不同等因素造成的对杀菌剂敏感性的差异。例如:对多菌灵来说,稻瘟病菌、核盘菌的敏感性就有所不同;同是核盘菌,不同菌株的敏感性也不相同。耐药性的高低不是由于杀菌剂的长期应用而产生的。

与耐药性相反,植物病原菌的**抗药性(resistance)**,是指由于在同一地区,连续使用同一种杀菌剂使植物病原菌对杀菌剂的敏感性明显降低的现象。例如:应用苯来特连续防治花生叶斑病两年以后,花生叶斑病菌对苯来特的可耐浓度提高了10倍,说明该菌株对苯来特产生了抗药性;由于对多菌灵的长期使用,灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)菌株能够在含有1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 多菌灵的培养基上生长,对多菌灵的敏感性比初用时下降了500倍,说明该菌对多菌灵产生了抗药性。

植物病原菌的抗药性,一般是通过比较杀菌剂对抗性菌株和敏感菌株的有效中浓度(EC_{50})或有效中量(ED_{50})来确定的。如果杀菌剂对植物病原菌的有效中浓度(EC_{50})或有效中量(ED_{50})提高了5~10倍以上,就可以认为植物病原菌对该药剂产生了抗药性。

由于有些杀菌剂的作用机理很相似,植物病原菌常常因为对一种杀菌剂产生了抗药性,而对另一种从未使用过的,但作用机理相似的药剂也出现了抗性,这样的现象被称为**交互抗药性(cross resistance)**。例如,马铃薯晚疫病菌对甲霜灵和恶霜灵的抗药性就属于这种类型^[17]。另外,植物病原菌对苯并咪唑类不同杀菌剂也容易产生交互抗药性,当病原菌对苯来特产生抗药性以后,往往对甲基托布津、多菌灵和噻菌灵等其他苯并咪唑类杀菌剂也具有抗药性。

与交互抗药性相反,有的植物病原菌会因为对某一种杀菌剂产生了抗药性,而对另一种从未使用过的药剂敏感性更强,这样的现象被称为**负交互抗药性(negative cross resistance)**。例如,抗苯并咪唑的灰霉病菌对 *N*-苯基氨基甲酸酯更加敏感就属于负交互抗药性^[18]。另外,对多菌灵高抗的梨黑星病菌(*Venturia nashicola*)菌株也对 *N*-苯基氨基甲酸酯更加敏感,而对多菌灵中抗或低抗的 *Venturia nashicola* 菌株对 *N*-苯基氨基甲酸酯并非更敏感。

负交互抗药性可以在植物病原菌的化学防治中加以利用。这方面,在 *Venturia nashicola* 的多菌灵高抗菌株的防治中有所尝试。

在某些病原菌中,所具有的多个抗性基因是相互独立的,它们能够导致这些病原菌同时对多种类型的杀菌剂同时产生抗性,这种现象叫作**多重抗药性(multiple resistance)**。例如有些黄瓜霜霉病菌就能同时对苯并咪唑类、羟基嘧啶类和甾醇合成抑制剂产生抗药性。这是不同于交互抗药性的。

另外,有的抗药性还具有**多效性(pleiotropy)**,抗性菌的抗性基因可以同时引起其他的性状,例如,对低温或高温的敏感性。

第二节 植物病原菌对不同杀菌剂的抗药性

到目前为止,抗药性已经在许多种植物病原菌上出现,尤以对内吸性杀菌剂的抗药性出现得最多。在内吸性杀菌剂中,苯并咪唑类和托布津类化合物最为著名。这主要是因为它们具有出色的内吸性和很高的杀菌效果,因而应用非常广泛。然而不幸的是,由于在它们所防治的许多植物病原菌中出现了抗药性问题,严重地威胁着它们的应用价值。据 Delp 报道,到 1979 年为止,对苯并咪唑类杀菌剂产生抗药性的植物病原菌已达 16 个不同的属^[19]。

下面将对主要的植物病原菌对不同杀菌剂产生抗药性的情况作一简要的介绍。

一、不同植物病原菌对多菌灵的抗药性

(一) 灰霉病菌对多菌灵的抗药性(resistance to carbendazim)

在土耳其南部和东南部,由于苯并咪唑类杀菌剂——多菌灵在大棚蔬菜病害防治中的广泛使用,灰霉病菌已经对多菌灵产生了很高的抗性。在所测的 12 个菌株中,有 6 个菌株能够在含有 $1500\mu\text{g/mL}$ 多菌灵的培养基上生长(表 1-1)。其中菌株 B-1 对多菌灵的敏感性比初用时下降了 500 倍^[7]。

在我国,由于对多菌灵长期而广泛的应用,也引起了该菌对多菌灵抗性菌株的大量出现。例如,通过测定江苏省和上海市 8 个县、区的草莓灰霉病菌菌株,发现在所测菌株中,绝大多数菌株都产生了抗药性。抗性菌株还可以通过紫外光照射而诱导产生。进一步的研究表明,抗性菌株的抗药性很稳定,但它们的产孢能力明显下降^[20]。

表 1-1 灰霉病菌菌株对多菌灵的敏感性

菌株号	寄主	不同浓度/ $(\mu\text{g/mL})$ 下生长 5 天后的菌落半径/mm					
		0	1	5	500	1 000	1 500
B-1	番茄	8.00	20.10	17.25	14.30	0	0
B-2	番茄	29.90	0	0	0	0	0
B-3	黄瓜	43.79	44.00	43.88	44.50	17.91	21.62
B-4	胡椒	37.40	28.75	36.50	33.55	38.50	34.45
B-5	番茄	39.05	35.15	35.00	33.40	27.16	16.16
B-6	茄子	33.67	36.00	36.70	24.80	29.18	27.90
B-7	茄子	36.89	38.85	31.90	35.20	33.56	28.35
B-8	黄瓜	22.00	39.75	34.50	17.85	16.55	10.85
B-9	番茄	45.00	0.90	0.80	1.05	0.20	0
B-10	黄瓜	20.40	0.20	0	5.00	0	0
B-11	草莓	39.10	0	0	0	0	0
B-12	番茄	43.41	0	0	0	0	0

(二) 立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)对多菌灵的抗药性

此外,经过对温室里蔬菜上分离到的立枯丝核菌菌株的测定,发现 4 个菌株中有 1 个菌株能够在含有 $5\mu\text{g/mL}$ 多菌灵的培养基上正常生长(表 1-2)。培养 5 天后,处理与对照的生长状况基本一致,菌落大小完全一样。其余 3 个菌株只能在含有 $1\mu\text{g/mL}$ 多菌灵的培养基上正常生长^[7]。

表 1-2 立枯丝核菌不同菌株对多菌灵的敏感性

菌株号	不同浓度/($\mu\text{g/mL}$)下生长 5 天的菌落半径/mm			
	0	1	5	50
R-1	44.30	45.00	0	0
R-2	41.60	45.00	0	0
R-3	45.00	45.00	0	0
R-4	45.00	45.00	45.00	0

(三) 核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)对多菌灵的抗药性

对核盘菌在不同蔬菜寄主上 6 个菌株的生物测定表明,其中 3 个菌株对多菌灵产生了抗药性,均能在含有 $5\mu\text{g/mL}$ 多菌灵的培养基上正常生长(表 1-3)。这 3 个菌株都是从温室里黄瓜菌核病株上分离到的^[7]。

表 1-3 核盘菌对多菌灵的敏感性

菌株号	寄主	不同浓度/($\mu\text{g/mL}$)下生长 5 天的菌落半径/mm				
		0	1	5	1500	2500
SS-1	黄瓜	45.00	42.18	42.75	0.20	0.22
SS-2	莴苣	45.00	0	0	0	0
SS-3	黄瓜	45.00	0	0	0	0
SS-4	茄子	45.00	0	0	0	0
SS-5	黄瓜	45.00	40.63	40.41	0	0
SS-6	黄瓜	45.00	45.00	45.00	0	0

另据作者观察,在英国南部,该菌的一个油菜菌株(YQ-Y)对多菌灵的忍受上限浓度仅为 $3.00\mu\text{g/mL}$ 。为了求得该菌株对多菌灵的忍受上限浓度,对菌株 YQ-Y 在不同多菌灵浓度下的生长状况进行了测试。所用多菌灵浓度分别为: 0.03 、 0.30 、 3.00 和 $30.00\mu\text{g/mL}$ 。每个处理重复 3 次。

在 3.00 、 $30.00\mu\text{g/mL}$ 浓度下,该菌的生长受到非常严重的抑制(高于 97.8%,见表 1-4),没有任何正常的菌丝生长,所长出的极个别菌丝非常细、非常短。为了了解在含 $0.30\mu\text{g/mL}$ 以上多菌灵 PDA 上长出的菌丝是否还能恢复正常生长,将这些菌丝分别接种到 PDA 和含 0.03 、 0.30 、 3.00 、 $30.00\mu\text{g/mL}$ 多菌灵 PDA 培养基上继续培养。5 次重复实验的结果表明,只有在含 $0.30\mu\text{g/mL}$ 以下多菌灵 PDA 上长出的不正常菌丝能恢复正常生长。其他菌丝都彻底地失去了生长能力。说明其忍受上限浓度在 $3.00\mu\text{g/mL}$ 以下(表 1-5)。

表 1-4 不同浓度多菌灵对核盘菌菌株的生长抑制率

处理浓度/($\mu\text{g/mL}$)	菌落平均半径/mm	生长抑制率/%
0.00	43.0	
0.03	34.0	24.4
0.30	21.7	51.8
3.00	1.0	97.8
30.00	0.7	98.5

表 1-5 经多菌灵处理菌株在不同条件下的菌落生长半径/mm

处理浓度/($\mu\text{g/mL}$)	菌丝来源浓度/($\mu\text{g/mL}$)		
	0.3	3	30
0.0	30	0	0
0.3	25	0	0
3.0	0	0	0
30.0	0	0	0

为测定多菌灵对 YQ-Y 菌株的有效中浓度(EC_{50}),将该菌株菌丝,接种在含不同浓度多菌灵培养基的中央,每一浓度分 3 天重复 9 次,在 22°C 条件下进行培养,36 小时后观察记录菌落半径(表 1-6)。经计算求得不同浓度的多菌灵对上述菌株的生长抑制率。

表 1-6 YQ-Y 菌株在多菌灵处理 36 小时后的菌落生长

处理浓度/ ($\mu\text{g/mL}$)	菌落生长半径/mm							平均数	标准误
	1		2		3				
	平均数	标准误	平均数	标准误	平均数	标准误			
0.00	28.0	0.6	30.5	0.9	36.0	1.0	31.4	4.2	
0.03	20.0	1.0	21.7	1.2	36.7	0.6	22.8	3.5	
0.30	11.7	0.6	16.3	1.5	14.7	0.6	14.2	2.3	
3.00	0.7	0.3	0.3	0.6	1.5	0	0.8	0.6	

根据生长抑制率,进而求出该菌株的有效中浓度(EC_{50})。YQ-Y 菌株的有效中浓度(EC_{50})为 $0.15\mu\text{g/mL}$,95% 以上的置信限为 $0.12\sim 0.19\mu\text{g/mL}$ 。另外,多菌灵对其他 3 个菌株的有效中浓度(EC_{50})分别为:0.11、0.10、0.05(表 1-7)^[21]。

表 1-7 多菌灵对核盘菌不同菌株的有效中浓度(EC_{50})

核盘菌的不同菌株	有效中浓度—— EC_{50} /($\mu\text{g/mL}$)	
	有效中浓度值	95%置信限
YQ-Y	0.15	0.12~0.19
YQ-P	0.11	0.05~0.25
YQ-L	0.10	0.04~0.26
YQ-S	0.05	0.02~0.14

注:YQ-P为豌豆菌株;YQ-L为亚麻菌株;YQ-S为大豆菌株。

(四) 枝孢属菌种(*Cladosporium* spp.)对多菌灵的抗药性

另外,在对枝孢属菌种 3 个菌株的研究中,发现它们都能在含有 $1000\mu\text{g/mL}$ 多菌灵的培养基上生长(表 1-8)。这 3 个菌株分别来自番茄、西瓜和黄瓜菌核病株,分别属于两个种^[7]。

表 1-8 枝孢属菌种不同菌株对多菌灵的敏感性

菌株号	寄主	不同浓度/($\mu\text{g/mL}$)下生长 11 天的菌落半径/mm				
		0	1	50	500	1000
C-1	番茄	18.83	17.85	17.25	16.65	17.95
C-2	西瓜	19.87	15.91	24.33	22.79	1.70
C-3	黄瓜	11.82	9.37	7.25	12.25	10.75

注:C-1为黄枝孢(*C. fulvum*);C-2为枝孢属菌种;C-3为枝孢属菌种。

(五) 甜菜叶斑病菌(*Cercospora beticola*)对多菌灵的抗药性

据报道^[22],在我国山东、江苏的部分地区自 1974 年开始使用多菌灵防治甜菜叶斑病[由甜菜叶斑病菌(也称甜菜生尾孢)造成],4 年以后就出现了防治效果严重下降的现象,从 78.8%下降到 20%。经过对 563 个菌株进行测定,发现许多菌株已经对多菌灵产生了抗药性。研究表明,连续使用多菌灵 3~4 年,就足以导致该菌对多菌灵产生抗药性,并且其抗性比较稳定,即使停止使用多菌灵 3 年,抗药性仍不消失。其抗性菌株还可以通过种子向其他地区扩散。

根据多菌灵对该菌的有效中浓度(EC_{50})的大小,可以将该菌菌株分成三类^[23]:①敏感型,有效中浓度为 $0 \sim 10\mu\text{g/mL}$;②中抗型,有效中浓度为 $20 \sim 50\mu\text{g/mL}$;③高抗型,有效中浓度在 $50\mu\text{g/mL}$ 以上(表 1-9)。

表 1-9 甜菜叶斑病菌对多菌灵抗性菌株不同类型的分布

菌株来源	菌株数	不同抗性类型的菌株数		
		敏感型	中抗型	高抗型
内蒙古	77	21	40	16
宁夏	68	27	27	14
吉林	60	23	25	12
江苏	40	35	5	0

(六) 球座尾孢菌(*Cercospora personata*)和落花生尾孢菌(*C. arachidicola*)对多菌灵的抗性

另外研究表明,球座尾孢菌和落花生尾孢菌也已经对多菌灵产生了程度不同的抗药性。通过对广东、山东、江苏等地 54 个菌株的测定,发现在这些菌株中存在着敏感、中抗和高抗三种类型。有效中浓度(EC_{50})为 $0\sim 10\mu\text{g/mL}$ 的属于敏感型;有效中浓度(EC_{50})为 $20\sim 50\mu\text{g/mL}$ 的属于中抗型;有效中浓度(EC_{50})为 $50\mu\text{g/mL}$ 以上的属于高抗型。三种类型所占的比例分别为 35%、42% 和 22%(表 1-10)。

表 1-10 尾孢菌属不同菌种对多菌灵的抗性类型

病原菌	来源	菌株数	不同抗性类型菌株数		
			敏感型	中抗型	高抗型
球座尾孢	江苏	3	0	2	1
	广东	9	3	4	2
	江苏	3	0	2	1
	山东	10	4	4	2
落花生尾孢	江苏	5	2	1	2
	广东	8	3	4	1
	江苏	7	3	3	1
	山东	9	4	3	2

(七) 麦类赤霉病菌(*Fusarium graminearum*)对多菌灵的抗药性

据报道,通过对江苏、安徽、上海、福建、河北和黑龙江等省(市)的禾谷镰孢菌株的监测发现,对多菌灵抗性菌株已经出现,但出现的频率较小。另外,紫外光照射可以诱导抗性的产生。田间采到的抗性菌株与紫外光照射诱导产生的抗性菌株相比,对多菌灵的抗性更高。