

番茄早疫病菌抗感异菌脲菌株特性研究

任璐, 刘慧平, 韩巨才*

(山西农业大学 农学院, 山西 太谷 030801)

摘要:测定不同营养条件、温度和 pH 值对番茄早疫病菌抗感异菌脲菌株生长的影响。结果表明, 抗感菌株均在以蛋白胨为氮源的培养基中生长最快, 敏感菌株在以可溶性淀粉为碳源的培养基中生长最快, 突变体和抗性菌株在以乳糖为碳源的培养基上生长最快。突变体在 pH 值为 7 时生长最快而敏感菌株在 pH 值为 6 时生长最快, 在不同 pH 值条件下, 敏感菌株都比突变体生长速度快。在 4~35 ℃ 菌丝均能生长, 以 20~25 ℃ 生长最快。测定抗感菌株对渗透压的敏感性和菌丝内的甘油、可溶性糖含量。结果发现, 突变体比亲本菌株对渗透压具有较高的敏感性, 所有抗性菌株在含高于 10 g/L NaCl 的 PDA 平板上菌落直径随着 NaCl 质量浓度的升高而减小, 在含高于 40 g/L NaCl 的平板上停止生长。含药培养液中敏感菌株菌丝内甘油合成大量增加和积累, 突变体和抗性菌株菌丝内甘油含量增加较少或有所下降, 菌丝内可溶性糖含量变化不明显。

关键词:植物病原真菌; 抗药性; 二甲酰亚胺类杀菌剂

中图分类号: S436.412.1⁺4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-2286(2010)02-0283-06

A Study of Characteristics of Iprodione-sensitive and Resistant *Alternaria solani*

REN Lu, LIU Hui-ping, HAN Ju-cai*

(College of Agronomy, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract: The influence of different nutritional conditions, temperature and pH value on iprodione-sensitive and -resistant *Alternaria solani* was determined. The results showed that both resistant and sensitive strains grew fastest in the culture medium with peptone as nitrogen source, sensitive strains grew fastest with starch while resistant ones with lactose as carbon source. The favorable pH value of mutants was 7 and that of sensitive strains was 6, sensitive strains grew faster at different pH conditions. They could all grow at 4~35 ℃. The sensitivity to osmotic stress and the impact of iprodione to generation of glycerol and monosaccharide in hyphae were determined. The results showed that all the selected resistant strains had a higher osmosensitivity than the sensitive strains, and the colony diameter decreased as the NaCl concentration increased in the PDA with more than 10 g/L NaCl, then the growth stopped in the PDA with 40 g/L NaCl. The generation of glycerol of sensitive strains increased significantly in the culture medium with iprodione, but glycerol content of mutants and resistant strains increased less or declined. The monosaccharide content of hyphae changed insignificantly with iprodione.

Key words: phytopathogenic fungi; resistance; dicarboximide fungicide

收稿日期: 2009-12-11 修回日期: 2010-03-04

基金项目: 山西省留学归国基金(2007061, 2009043)和山西省攻关项目(20070301039)

作者简介: 任璐(1982-), 女, 博士生, 主要从事农药毒理学研究, E-mail: renlubaby@163.com; *通讯作者: 韩巨才, 教授, 博士生导师, 主要从事农药毒理与天然产物农药研究, E-mail: Jchan@sxau.edu.cn

番茄早疫病菌 (*Alternaria solani*) 是番茄重要病害之一。近年来, 由于一些地区推广抗病毒病而不抗早疫病的番茄品种, 导致番茄早疫病的严重发生。发病严重时引起落叶、落果和断枝, 对产量影响很大, 比常年减 20% ~ 30%, 严重时可达 50% 以上, 甚至绝产^[1]。二甲酰亚胺类杀菌剂异菌脲 (iprodione) 是目前防治该类病害的有效药剂, 具有保护和一定的治疗作用^[2-3]。随着该类药剂使用时间的延长, 植物病原真菌对其抗药性问题日益严重。链核盘菌 (*Monilinia necticola*)、核盘菌 (*Sclerotinia ham oecarpa*) 和白腐小核菌 (*Sclerotium cepivorum*) 等重要的植物病原真菌均有对其产生田间抗性的报道^[4]。为了解抗药性的产生、发展及其原理, 寻找新的、有效的抗药性检测方法与综合治理措施, 本文比较了番茄早疫病菌抗异菌脲突变体与敏感菌株的生物学特性及生理生化特性。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 供试菌株 从山西农业大学化保实验室已测定的 128 株番茄早疫病菌菌株随机选取敏感菌株 WZ28、WZ38、WZ35、WZ29、WZ42、CZ04; 田间抗性菌株 CZ15、CZ23; 并通过紫外诱导和药剂驯化的方法^[5]获得抗性突变体 WZ38R、WZ29R、WZ29R3、WZ29R4、WZ35R、QX21R。

1.1.2 供试药剂 250 g/L 异菌脲悬浮剂 (陕西标正作物科学有限公司); 麦芽糖、乳糖、可溶性淀粉、蛋白胨、葡萄糖、苯酚、硫酸 (比重 1.84)、蔗糖, 以上试剂均为分析纯; 甘油含量测定试剂盒 (Glycerol Determination Kit, 德国 Roche 公司)。

1.1.3 仪器 显微照相机; 震荡培养箱; 恒温培养箱; 无菌操作台。

1.2 方 法

1.2.1 不同营养条件对突变体菌丝生长的影响 供试碳源: 葡萄糖、蔗糖、可溶性淀粉、甘露醇、麦芽糖、乳糖; 供试氮源: 蛋白胨、KNO₃、缺氮处理。基本培养基为理查 (Richard) 培养基^[6], 不同碳源相当于理查培养基中 50 g 蔗糖含碳量置换其中的蔗糖, 不同氮源相当于理查培养基中 10 g KNO₃ 含氮量置换其中的 KNO₃, 将各培养基倒入灭菌培养皿中制成平板, 每处理 3 皿, 每皿放入 5 mm 菌碟于 25 ℃ 恒温箱中培养, 分别在 72 h 后测量菌落直径, 计算菌丝生长速度。

1.2.2 酸碱度对菌丝生长的影响 用 0.1 mol/L 的 HCl 和 0.1 mol/L 的 NaOH 无菌操作, 供试 PDA 培养基分别调整酸碱度为 pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 每一酸度重复 3 次, 每皿放 1 片 5 mm 的菌碟, 25 ℃ 恒温培养, 每隔 24 h 测 1 次菌落直径, 计算菌丝生长速度^[7]。

1.2.3 温度对菌丝生长的影响 用 5 mm 打孔器切取菌碟, 无菌操作下移入直径为 9 cm 的 PDA 平板中, 每皿 1 块, 每处理重复 3 次, 分别置于 5 个不同处理温度的恒温箱、冰箱中培养, 每隔 24 h 观察 1 次菌落直径, 计算菌丝生长速度^[8]。

1.2.4 渗透压敏感性测定 将异菌脲抗感菌株在 PDA 平板上 25 ℃ 培养 3 d 后分别接入含 5, 10, 20, 30, 40 g/L 的 NaCl 及对照的 PDA 培养基平板上, 每处理重复 3 次, 25 ℃ 恒温培养 5 d 后, 测量菌落直径, 每菌株重复 3 次。

1.2.5 菌丝甘油含量测定 将病原菌接入 PDA 培养液中, 25 ℃、140 r/min 振荡培养 5 d 后, 去除菌碟, 用去离子水重复冲洗、过滤菌丝, 真空抽滤 15 min。取 7 g 左右鲜菌丝, 加入 5 mL 乙醇 [(乙醇) = 80%] 和少量石英砂, 研磨成匀浆。10 000 ×g 离心 5 min, 取上清即样品溶液。采用甘油检测试剂盒 (Glycerol Determination Kit, 德国 Roche 公司) 测定菌丝甘油含量。

1.2.6 可溶性糖含量的测定 (1) 标准曲线的绘制。向试管内加入 1 mL 苯酚 [(苯酚) = 9% 溶液], 再以 5 ~ 20 s 加入 5 mL 浓硫酸, 摇匀。比色液总体积为 8 mL, 在室温下放置 30 min, 比色。然后以空白为参比, 在 485 nm 波长下比色, 以糖含量为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线, 求出标准直线方程。(2) 测定。吸取 0.5 mL 样品液于试管中 (重复 2 次), 加蒸馏水 1.5 mL, 同制作标准曲线的步骤, 按顺序分别加入苯酚、浓硫酸溶液, 显色并测定吸光度。由标准曲线查出糖的量。(3) 结果计算。按下式计算测试样品的糖含量: 可溶性糖含量 = 从标准曲线查得糖的量 (μg) × 提取液体积 (mL) × 稀释倍数 [测定用样品液的体积 (mL) × 样品质量 (g) × 10⁶] × 100%。

2 结果与分析

2.1 不同营养条件对菌丝生长的影响

结果表明(表 1),不同病原菌在不同碳源培养基上生长速率略有不同,亲本菌株 WZ48和 WZ42在以可溶性淀粉为碳源的培养基上生长最快,其次是麦芽糖、蔗糖,葡萄糖最慢。而抗性菌株在以乳糖为碳源的培养基上生长最快,CZI5在乳糖培养基的生长速率达到 0.325 mm/h,较敏感菌株生长速率快,二株抗性突变体也均以乳糖为最好,其生长速率分别为 0.275 mm/h和 0.325 mm/h。

在本试验设计的不同氮源培养基上突变菌株生长速率均比其亲本菌株慢得多,但均以蛋白胨为氮源的培养基上生长最快;缺 N 处理的培养基对敏感菌株生长的影响较其他含氮培养基没有明显不同,而对抗性菌株和突变体有较大的影响。在含蛋白胨的培养基上抗感菌株菌丝生长均比其余 2 种氮源培养基稠密。

表 1 不同营养条件下抗感菌株菌丝的生长速度

Tab 1 The growth rate of the mycelium of mutants and sensitive strains under different nutrition conditions mm/h

菌株 (类型)	乳糖	蔗糖	葡萄糖	淀粉	麦芽糖	蛋白胨	KNO ₃	缺 N 处理
Isolate (Types)	lactose	Sucrose	Glucose	Starch	Maltose	Peptone		N free
WZ48 (S)	0.186	0.201	0.133	0.299	0.214	0.464	0.201	0.283
WZ35R (R)	0.275	0.244	0.214	0.228	0.238	0.396	0.244	0.202
WZ42 (S)	0.208	0.208	0.208	0.342	0.250	0.558	0.208	0.242
CZI5 (R)	0.428	0.381	0.401	0.426	0.440	0.463	0.381	0.213
WZ29R (R)	0.325	0.144	0.186	0.178	0.229	0.381	0.144	0.162

S表示敏感菌株,R表示抗性菌株。S indicates sensitive strains R indicates resistant strains

2.2 酸碱度对菌丝生长的影响

结果表明(表 2),抗感菌株在 pH 3~12 均能生长,中性偏酸条件下生长最快,pH 5~7 最适合菌丝生长,过酸的环境不利于菌丝生长,而在 pH > 8 的条件下敏感菌株与突变体随着 pH 的升高菌丝生长的速度没有明显变化,其区别在于:在不同 pH 值条件下,敏感菌株都比突变体生长速度快。由表 2 还可以看出,在最适 pH 值范围内,敏感菌株在 pH 6 时生长最快,其菌丝生长速率为 0.325~0.383 mm/h,而突变体在 pH = 7 时生长最快,菌丝生长速率为 0.192~0.332 mm/h,可见二者生长最适 pH 值有所不同。

表 2 不同 pH 值下突变体与敏感菌株菌丝的生长速度

Tab 2 The growth rate of the mycelium of mutants and sensitive strains under different pH conditions mm/h

时间 /h	菌株 (类型)	pH									
		3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Time	Isolate (Types)										
24	WZ35 (S)	0.000	0.229	0.292	0.325	0.292	0.163	0.108	0.089	0.095	0.085
	WZ35R (R)	0.000	0.083	0.138	0.163	0.192	0.125	0.093	0.076	0.088	0.082
48	WZ35 (S)	0.042	0.293	0.313	0.354	0.333	0.271	0.240	0.239	0.228	0.233
	WZ35R (R)	0.031	0.25	0.261	0.304	0.328	0.298	0.198	0.189	0.187	0.188
72	WZ35 (S)	0.072	0.347	0.337	0.368	0.333	0.278	0.260	0.287	0.271	0.259
	WZ35R (R)	0.067	0.236	0.292	0.322	0.328	0.285	0.243	0.243	0.234	0.242
120	WZ35 (S)	0.096	0.361	0.365	0.383	0.365	0.283	0.277	0.274	0.253	0.278
	WZ35R (R)	0.085	0.303	0.289	0.316	0.332	0.259	0.262	0.267	0.248	0.268

2.3 温度对菌丝生长的影响

结果见表 3,菌丝的生长总体趋势是先慢后快,20 时,在 24 h 内敏感菌株 WZ35 与突变体 WZ35R 菌丝生长速率分别为 0.187 mm/h,0.167 mm/h;在 24~48 h 为 0.297 mm/h,0.262 mm/h。从温度处理来看,4 时菌丝基本不能生长,以 20~25 生长最快。在 4~25 随温度升高,抗感菌株菌丝生长速度逐渐加快,48 h 内 25 平均生长速率分别以 WZ35 0.292 mm/h,WZ35R 0.305 mm/h 为最大,4

时平均生长速率分别以 0 mm/h, 0.004 mm/h 为最小。在 25~35 随温度升高, 菌丝生长速率逐渐下降, 在 24 h 内突变体生长速率均比敏感菌株快, 24 h 以后 WZ35 生长速率明显快于 WZ35R。

表 3 不同温度下突变体菌株与敏感菌株菌丝的生长速度

时间 /h Time	菌株 Strain	4	15	20	25	30	35
24	WZ35 (S)	0.000	0.169	0.187	0.208	0.167	0.011
	WZ35R (R)	0.002	0.153	0.167	0.188	0.125	0.011
48	WZ35 (S)	0.006	0.233	0.297	0.305	0.250	0.063
	WZ35R (R)	0.004	0.225	0.262	0.295	0.229	0.052
72	WZ35 (S)	0.011	0.287	0.303	0.373	0.228	0.071
	WZ35R (R)	0.010	0.234	0.296	0.315	0.209	0.069
96	WZ35 (S)	0.023	0.264	0.288	0.313	0.219	0.031
	WZ35R (R)	0.006	0.240	0.286	0.302	0.194	0.031
120	WZ35 (S)	0.024	0.288	0.312	0.350	0.162	0.017
	WZ35R (R)	0.021	0.276	0.293	0.333	0.144	0.016

2.4 渗透压敏感性测定结果

结果见表 4, 敏感菌株的菌落直径随 NaCl 质量浓度升高而增大, 突变体和抗性菌株在 NaCl 质量浓度大于 10 g/L 的平板上菌落直径随 NaCl 浓度升高而减小, 且所有突变体的菌丝生长均比其亲本菌株慢, 与敏感菌株在 10 g/L 以上 NaCl 平板上菌落直径有明显差异。在含有高于 40 g/L NaCl 的平板上停止生长 (图 1)。这表明抗性突变体表现为渗透压敏感。不同抗性菌株对渗透压的敏感性在 5% 及 1% 水平上有显著差异。

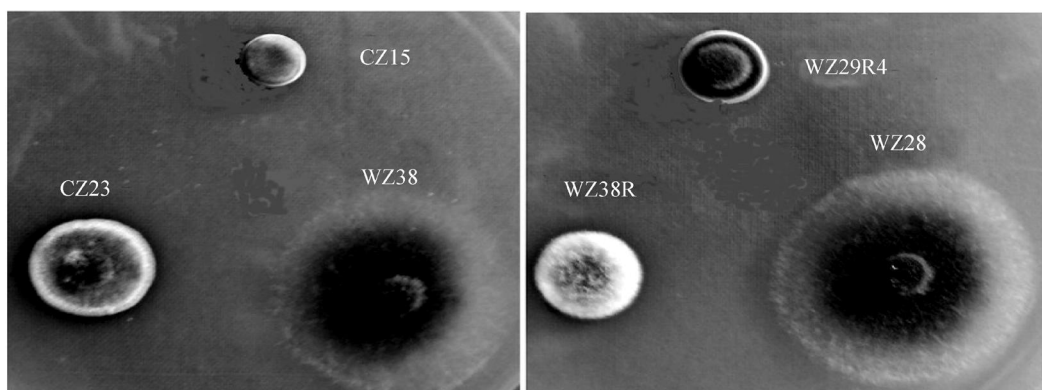


图 1 含 40 g/L NaCl 的 PDA 平板上生长 3 d 的菌落形态
Fig 1 Colony morphology on PDA with 40 g/L NaCl for 3 days

2.5 菌丝甘油含量测定结果

在不含药培养液中培养后, 敏感菌株菌丝甘油含量略低于抗性菌株。但在含药培养液中培养后, 敏感菌株菌丝内甘油含量急剧上升, 分别提高 651.4% 和 497.8%; 而抗性菌株菌丝内甘油含量明显低于敏感菌株, 在含药培养液中培养后, CZ15 仅增加了 10.69%, 而 WZ38R 甘油含量下降 6.145% (表 5)。

2.6 抗性菌株菌丝可溶性糖含量比较

苯酚法可测定出菌丝内可溶性单糖的含量。试验表明, 在含药培养液中培养后, 敏感菌株与抗性菌株菌丝内可溶性糖的含量均变化不明显。敏感菌株在含药培养基中可溶性糖含量增加 40% 左右, 抗性菌株增加 20% 左右或有所减少 (表 6)。

表 4 培养基中不同 NaCl 质量浓度下抗感菌株菌落直径

Tab 4 Colony diameter of sensitive - and resistant - *A. solani* under different NaCl concentration

菌株 Isolate	NaCl 质量浓度 / (g · L ⁻¹) NaCl concentration					
	CK	0.5	1	2	3	4
WZ28	6.0	5.3	5.8aA	6.0aA	6.4aA	6.5aA
WZ38	5.9	5.0	5.6aA	5.5aA	6.1aA	6.0aA
WZ29R3	5.5	4.5	4.7cC	3.8bcC	2.7bB	0.5dD
WZ29R4	4.9	4.6	4.5eE	3.4cC	2.0dD	0.9bcdBC
WZ38R	5.0	4.7	4.5eE	3.1dD	2.8bB	1.0bcBC
QX21R	5.6	4.9	4.6cdCD	4.0bB	2.4cC	1.0bcBC
CZ15	5.9	5.3	5.5bB	3.9bcC	2.7bB	0.7cdBC
CZ23	5.3	5.0	4.7cC	3.5cC	2.3cC	1.2bB

a代表 0.05 水平, A 代表 0.01 水平。A is level 0.05. A is level 0.01.

表 5 番茄早疫病菌抗感异菌脲菌株菌丝甘油生成含量比较

Tab 5 Comparison of glycerol content between sensitive - and resistant - *A. solani*

菌株 Isolate	不含药培养液中甘油含量 / (mg · g ⁻¹) Glycerol content of <i>A. solina</i> with iprodione	含药培养液中甘油含量 / (mg · g ⁻¹) Glycerol content of <i>A. solina</i> without iprodione	甘油含量增加 / % Increase of glycerol content
	WZ38	0.416 × 10 ⁻³	3.126 × 10 ⁻³
CZ04	0.491 × 10 ⁻³	2.935 × 10 ⁻³	497.8
WZ38R	0.830 × 10 ⁻³	0.779 × 10 ⁻³	- 6.145
CZ15	0.926 × 10 ⁻³	1.025 × 10 ⁻³	10.69

表 6 番茄早疫病菌抗感异菌脲菌株菌丝可溶性糖生成含量比较

Tab 6 Comparison of monosaccharide content between sensitive - and resistant - *A. solani*

菌株 Isolate	不含药培养液中可溶性糖含量 / (μg · mL ⁻¹) Monosaccharide content of <i>A. solina</i> with iprodione	含药培养液中可溶性糖含量 / (μg · mL ⁻¹) Monosaccharide content of <i>A. solina</i> without iprodione	可溶性糖含量增加 / % Increase of monosaccharide content
	WZ38	216.4	312.26
WZ42	197.6	275.06	39.2
WZ38R	293.4	263.60	- 10.23
CZ15	124.3	151.15	21.6

3 讨论

本试验测定了不同营养条件、温度和 pH 值对抗感异菌脲菌株生长的影响,无论在对碳源和氮源的利用情况还是最适 pH 都有所不同:敏感菌株在以可溶性淀粉为碳源的培养基中生长最快,而突变体和抗性菌株在以乳糖为碳源的培养基上生长最快。缺 N 处理的培养基对敏感菌株的生长没有明显影响,而突变体和抗性菌株在缺 N 培养基上生长缓慢。突变体在 pH 值为 7 时生长最快而亲本菌株在 pH 值为 6 时生长最快。这一结果说明突变体的生理特性可能出现了变异,其生长发育的内源节律发生了变化。

微生物在高渗透压环境的胁迫下,大多都可以合成或从环境中吸收一些低分子量物质来调节自身的渗透压以平衡外界渗透压的增高^[9]。本试验中在相同渗透压条件下,敏感菌株比抗性菌株的生长速

率大得多,说明敏感菌株的渗透调节能力要大于抗性突变体。许多研究表明,甘油和阿拉伯糖是进行渗透压调节的主要调节因子^[10-13], Fujimura等^[14]认为,粗糙脉孢霉 *os*突变体的抗药性与其体内的甘油含量的降低有关。本研究说明,二甲酰亚胺类杀菌剂异菌脲能诱导敏感菌株菌丝内甘油合成大量增加和积累,可溶性糖的含量略有增加,而抗性菌株菌丝内甘油含量和可溶性糖略有增加或减少。这表明病菌抗药性可能与渗透压调节系统有关,即抗性菌株应对外界渗透压的调节能力要低于敏感菌株。

参考文献:

- [1] 邵玉琴,吕佩珂. 番茄早疫病发生、流行与生态因子关系的研究 [J]. 内蒙古大学学报:自然科学版, 1993, 24(2): 208 - 221.
- [2] 赵善欢. 植物化学保护 [M]. 3版. 北京:中国农业出版社, 2000.
- [3] 杨谦. 植物病原菌抗药性分子生物学 [M]. 北京:科学出版社, 2003: 62 - 63.
- [4] 刘波,叶钟音,刘经芬,等. 速克灵抗灰霉病菌株性质的研究 [J]. 植物保护学报, 1992, 19(4): 297 - 302.
- [5] 中国科学院微生物研究所. 微生物诱变育种 [M]. 北京:科学出版社, 1973.
- [6] 倪守延,杨文翠,张成林,等. 油菜菌核病营养生理研究 [J]. 安徽农业大学学报, 1995, 22(3): 246 - 250.
- [7] 史建荣,王裕中,沈素文,等. pH值对油菜菌核病菌生长的影响 [J]. 江苏农业科学, 1999, 27(3): 47 - 49.
- [8] 史建荣,王裕中,沈素文. 油菜菌核病菌的生物学特性研究 [J]. 植物保护, 1999, 25(1): 6 - 8.
- [9] Pott G B, Miller T K, Bartlett J A, et al. The isolation of *Fos* - 1 gene encoding a putative two - component histidine kinase from *Aspergillus fumigatus* [J]. Fungal Genetics and Biology, 2000, 31(8): 55 - 67.
- [10] Gadd G M, Chudek J A, Foster R, et al. The osmotic responses of *Penicillium ochrochloron*: Changes in intracellular solute levels in response to copper and salt stress [J]. J Gen Microbiol, 1984, 130(2): 1969 - 1975.
- [11] Hocking A D, Norton R S. Natural - abundance ¹³C nuclear magnetic resonance studies on the intracellular solutes of xerophilic fungi [J]. J Gen Microbiol, 1983, 129(9): 2915 - 2925.
- [12] Lewis D H, Smith D C. Sugar alcohols (polyols) in fungi and green plants (I): Distribution, physiology and metabolism [J]. New Phytologist, 1967, 66(2): 143 - 184.
- [13] Luard E J. Effect of osmotic shock on some intracellular solutes in two filamentous fungi [J]. J Gen Microbiol, 1982, 128(11): 2575 - 2581.
- [14] Fujimura M, Ochiai N, Ichiishi A, et al. Effect of phenylpyrrole fungicides and osmotic stress on glycerol content in *os* and cut mutant strains of *Neurospora crassa* [J]. J Pestic Sci, 2000, 25(1): 31.