农药学学报 2019, 21(5-6): 747-758
Chinese Journal of Pesticide Science http://www.nyxxb.cn

·专论与综述·

DOI: 10.16801/j.issn.1008-7303.2019.0096

线粒体呼吸链复合物 III 抑制剂作用机制和抗性分子机制研究进展

张 灿[**,1]， 高续恒[**,2]， 周俞辛[1]， 刘西莉[*,1,2]

(1. 中国农业大学 植物保护学院，北京 100193；2. 西北农林科技大学 植物保护学院，陕西 杨凌 712100)

摘 要：复合物Ⅲ是真核生物线粒体电子传递链上的重要功能复合体，以复合物Ⅲ为靶标开发的呼吸抑制剂被广泛应用于真菌和卵菌病害防治。根据该类杀菌剂作用位点的不同，将复合物Ⅲ抑制剂分为 QoI、QiI 和 QioI 3 类，其中 QoI 类杀菌剂种类较多，且抗药性问题突出。本文总结了复合物Ⅲ抑制剂的作用机制和抗性分子机制，主要包括药剂靶标蛋白细胞色素 *b* (cyt *b*)G143A 和 F129L 的氨基酸取代、旁路氧化途径中交替氧化酶基因 (*AOX*) 的过量表达以及运输体机制等，旨在为该类杀菌剂的合理使用提供参考。

关键词: 呼吸链复合物Ⅲ抑制剂；杀菌剂；作用机制；抗药性；分子机制；研究进展

中图分类号：S482.2；TQ450.12 **文献标志码：**A **文章编号：**1008-7303(2019)5-6-0747-12

Research progress on mode action and molecular resistance mechanism of complex Ⅲ inhibitors in cellular respiration chain

ZHANG Can[**,1]， GAO Xuheng[**,2]， ZHOU Yuxin[1]， LIU Xili[*,1,2]

(1. *College of Plant Protection*, *China Agricultural University*, *Beijing* 100193, *China*; 2. *College of Plant Protection*, *Northwest A&F University*, *Yangling* 712100, *Shaanxi Province*, *China*)

Abstract: Complex Ⅲ is an essential component of cellular respiration chain, and complex Ⅲ inhibitors are widely used for the control of fungal and oomycete diseases worldwide. According to the binding sites of the fungicides on the complex Ⅲ, they could be divided into three types, including QoI, QiI and QioI fungicides. Among them, the QoIs are the most common fungicides, which also suffers from heavy problem of fungicide resistance. This review summarizes the mode of actions and molecular resistance mechanisms of complex Ⅲ inhibitors, such as the G143A and F129L amino acid substitutions in the target protein cytochrome *b* (cyt *b*), the overexpression of alternative oxidase gene (*AOX*) in the alternative oxidation pathway, and the transport mechanism, aiming to provide a reference for the rational use of complex Ⅲ inhibitors.

Keywords: complex Ⅲ inhibitor; fungicide; mode action; resistance; molecular mechanism; research progress

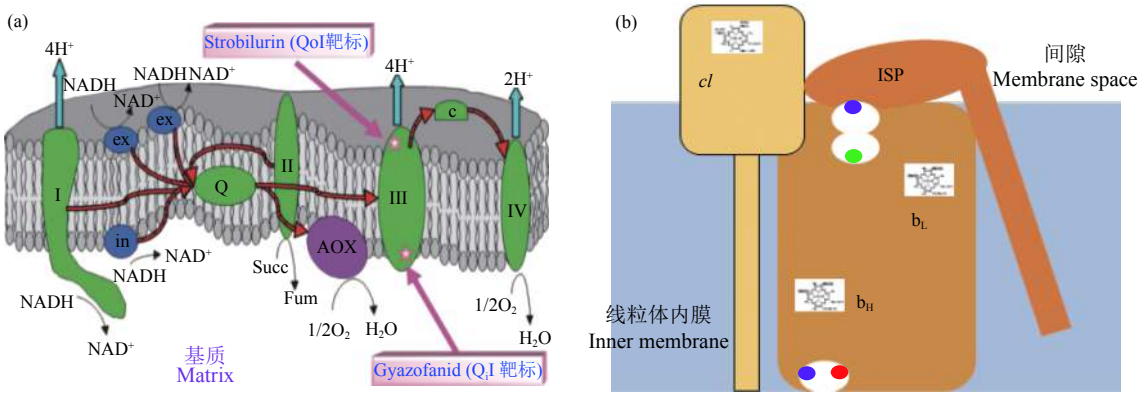
收稿日期：2019-08-22；**录用日期：**2019-09-01.

基金项目：国家重点研发计划项目（2016YFD0201305，2017YFD0200501）.

作者简介：[**]张灿，女，博士，主要从事杀菌剂抗性分子机制及病原卵菌基因功能研究，**E-mail：**czhang@cau.edu.cn；[**]高续恒，男，博士研究生，主要从事病原菌抗药性研究，**E-mail：**xuhenggao@163.com；[*]刘西莉，通信作者 (Author for correspondence)，女，博士，教授，主要从事植物病原菌与杀菌剂互作的分子基础与病害控制研究，**E-mail：**seedling@cau.edu.cn。[**]表示在本文中具有同等贡献。

线粒体是真核细胞中重要的细胞器，其携带线粒体 DNA (mtDNA)，自身存在一套非细胞核编码的复制、转录、翻译系统。线粒体的呼吸链位于线粒体内膜上，由 4 个分子质量很大的跨膜蛋白复合体 (Ⅰ~Ⅳ) 组成，是真核细胞进行呼吸作用、产生能量的主要场所[1]。复合物Ⅲ (细胞色素 *c* 还原酶复合体) 又称细胞色素 *bc1* 复合物，是一个多亚基的膜蛋白复合体，包括 11 个多肽链，在生理状态下以二聚体形式存在。每个复合体Ⅲ核心包含一个细胞色素 *b* (含两个血红素 b562/b_H 和 b566/b_L)、一个细胞色素 *c1* (含一个血红素 *c1*) 和一个铁硫蛋白 (FeS 蛋白)，这 3 个核心蛋白亚基负责将复合物Ⅰ和复合物Ⅱ的产物氢醌氧化，在此过程中，两个质子被释放到线粒体膜间隙，电子随后传递至膜间隙的细胞色素 *c*，完成电子的传递以及细胞色素 *c* 的还原[2]。复合体Ⅲ有两个醌的功能结合位点 (Quinone binding site)：一个是线粒体内膜外壁的醌氧化位点 Qo (Ubiquinol oxidation site)，位于膜间隙一侧，靠近血红素 b_L；另一个是线粒体内膜内壁的醌还原位点 Qi (Ubiquinone reduction site)，位于基质一侧，靠近血红素 b_H[3]。

呼吸链复合物Ⅲ的抑制剂被广泛用于世界范围内的真菌和卵菌病害防治，根据该类杀菌剂在复合物Ⅲ上作用位点的不同，可将其分为 3 类：一类是与线粒体内膜外壁的 Qo 位点的细胞色素 *b* 低势能血红素 (Qo-proximal) 结合的抑制剂，通过阻止细胞色素 *b* 和 *c1* 之间的电子传递，影响三磷酸腺苷 (ATP) 产生，从而干扰病原菌体内的能量循环，这类抑制剂称为 Qo 位点抑制剂 (简称 QoIs，又称 Strobilurin 类杀菌剂)(图 1a)[3-4]；另一类与位于线粒体内膜内壁 Qi 位点的细胞色素 *b* 高势能血红素结合，称为 Qi 位点抑制剂 (简称 QiIs)(图 1a)[5]；第 3 类可同时与细胞色素 *bc1* 复合物上的 Qo 和 Qi 位点结合，称为 Qio 位点抑制剂 (简称 QioIs)(图 1b)[6-8]。



注：b 图中绿色圆圈代表 QoI 类作用位点；红色圆圈代表 QiI 类作用位点；紫色圆圈代表 QioI 类作用位点。

Note: The green circle represents the binding site of QoI fungicide; the red circle represents the binding site of QiI fungicide; the purple circle represents the binding site of QioI fungicide.

图 1 QoI、QiI 和 QioI 类杀菌剂的作用位点[7-8]

Fig. 1 The binding sites of QoI, QoI and QioI fungicides[7-8]

复合物Ⅲ抑制剂具有安全、广谱、高效和环境友好的特点，其中 QoI 类杀菌剂是继苯并咪唑类和三唑类后，成功开发的一类具有里程碑意义的杀菌剂，但由于田间多频次的广泛使用，抗药性问题成为制约其发展的关键因素 (FRAC, http://www.frac.info/)。明确复合物Ⅲ抑制剂的作用机制和抗药性分子机制，不仅可以指导田间科学用药，延缓抗药性的发生，还可为开发以线粒体复合物Ⅲ为作用靶标的系列新型杀菌剂提供重要参考。因此，本文对目前生产上常用复合物Ⅲ抑制剂及其作用机制和抗性分子机制研究现状进行了概述。

1 研发情况

1.1 QoI 类杀菌剂研发

Musilek 等[9] 于 1969 年从担子菌 *Oudemansiella mucida* 中首次分离获得了甲氧基丙烯酸酯类天然产物 oudemansin A，1977 年 Anke 等[10] 从 *Strobilurus tenacellus* 中分离得到 strobilurin A 与 strobilurin B，并发现其具有优异的杀菌活性，1980 年 Gerth 等[11]

在 *Myxococcus fulvus* 中分离得到了 myxothiazol。Becker 等[12] 于 1981 年对 oudemansin A、strobilurin A、strobilurin B 和 myxothiazol 等该类天然产物的生物活性与构象关系进行了研究，发现该类天然产物活性优异，杀菌谱广且作用机制新颖，但缺点是稳定性较差，见光易分解，难以进行商品化生产。随后农药研究者开始关注此类抑制剂，并通过电子等排等方法改变活性基团，优化其理化性质以增强稳定性，进行了系列仿生药物的研发。其活性基团也已从最初的 β-甲氧基丙烯酸甲酯基拓展到：1) 甲氧基丙烯酸酯类，主要有嘧菌酯、啶氧菌酯、烯肟菌酯、苯醚菌酯、UBF-307 和嘧螨酯 (杀螨剂)；2) 甲氧基氨基甲酸酯类，主要有唑菌胺酯；3) 肟基乙酸酯类，常见的有醚菌酯和肟菌酯；4) 肟基乙酰胺类，包括苯氧菌胺、醚菌胺、肟醚菌胺和烯肟菌胺；5) 唑烷二酮类，如恶唑菌酮；6) 咪唑啉酮类，如咪唑菌酮；7) 肟基二噁嗪类，如氟嘧菌酯[13]。这些活性基团基本处于同一活性水平，并优于其他活性基团。当其几何异构体由反式 (*E*) 变为顺式 (*Z*) 时，活性骤减；当羰基 C＝O 变为硫代羰基 C＝S 时，活性亦大减[14]。尽管这些化合物的分子结构不同，但其具有相同的作用机制，并且由于早期发现的该类化合物活性基团均为 β-甲氧基丙烯酸酯结构，故将该类药剂统称为 Strobilurin 类 (甲氧基丙烯酸酯类) 杀菌剂，也被称为 QoI 类杀菌剂[15]。

1996 年先正达公司的嘧菌酯和巴斯夫公司的醚菌酯率先正式上市，随后该类杀菌剂陆续问世，包括先正达公司研发的肟菌酯、啶氧菌酯，巴斯夫公司研发的醚菌酯、醚菌胺、肟醚菌胺和吡唑醚菌酯，拜耳公司研发的氟嘧菌酯、肟菌酯、咪唑菌酮，杜邦公司开发的噁唑菌酮以及日本盐野义公司开发的苯氧菌胺等[16-17]。中国相关研究机构也对 QoI 类杀菌剂开展了系列研究，烯肟菌酯是中国沈阳化工研究院于 1997 年自主创制的第 1 个 QoI 类杀菌剂，于 2002 年进行登记。此外，沈阳化工研究院还发现了高活性的烯肟菌胺、丁香菌酯、氯啶菌酯、唑菌酯和唑胺菌酯等；浙江省化工研究院研发出高效杀菌活性的 QoI 类杀菌剂苯醚菌酯；华中师范大学也发现了一批高活性的 QoI 类化合物，并申请了国际 PCT 专利，其中以苯噻菌酯最具有代表性[18]。目前，烯肟菌酯、烯肟菌胺、丁香菌酯、唑菌酯和苯醚菌酯等具有自主知识产权的创新杀菌剂均已商品化。上述国际上已商品化的主要 QoI 类杀菌剂信息见表 1。

1.2 QiI 类和 QioI 类杀菌剂研发

QiI 类杀菌剂作用于位于线粒体内膜内壁的 Qi 位点，抑制血红素 b 到醌-半氢醌之间的电子传递，与 QoI 类杀菌剂不存在交互抗药性。该类杀菌剂品种较少，目前仅包括氰霜唑 (cyazofamid)、吲唑磺菌胺 (amisulbrom) 和 fenpicoxamid (目前尚无中文通用名) 3 种 (表 1)，其中以氰霜唑 (商品名科佳) 使用较为广泛。氰霜唑属于磺胺咪唑类杀菌剂，由日本石原产业株式会社 2001 年研发上市，具有优异的保护作用和一定的内吸治疗活性[19]。该杀菌剂于 2005 年在中国获得首次登记，对多种植物病原卵菌以及芸苔根肿菌 *Plasmodiophora brassicae* 具有很好的杀菌活性，且对卵菌的所有生长阶段均有作用，对甲霜灵抗性或敏感的病原菌均有活性，在田间主要用于卵菌病害的防治[20]。吲唑磺菌胺为日本日产化学公司创制的三唑磺酰胺类杀菌剂，结构新颖独特，目前对该类杀菌剂的抗药性研究内容较少，但为了延缓其抗性发展的速度，应加大对其混配产品的开发。

除以上 QoI 和 QiI 类杀菌剂的研发之外，2010 年巴斯夫又成功研发了一种作用机制独特的复合物 III 抑制剂唑嘧菌胺 (ametoctradin)(表 1)，其可同时与细胞色素 *bc1* 复合物上的 Qo 和 Qi 位点结合，称为 QioI 类杀菌剂[6]。2010 年初，唑嘧菌胺在罗马尼亚首先获得登记，主要用于防治葡萄上的晚疫病及霜霉病，同年该药剂在英国和荷兰获准登记，2013 年 8 月，唑嘧菌胺被列入欧盟农药登记条例已登记有效成分名单，用于葡萄、蔬菜和马铃薯卵菌病害防治[21]；2014 年 10 月，98% 唑嘧菌胺原药在中国获得登记，2018 年杀菌剂抗性行动委员会 (Fungicide Resistance Action Committee, FRAC) 将该药剂划分为 QoSI 杀菌剂[22]。

2 作用机制和遗传机制

Iwata 等[23] 于 1998 年解析出牛心完整的线粒体 *bc1* 复合物 (cyt *bc1*) 的晶体结构，使人们认识并了解线粒体的作用方式。随着牛、鸡、酵母等的线粒体细胞色素 *bc1* 复合物晶体结构的公布，关于其与不同类型复合物 III 抑制剂结合的晶体结构也不断得到解析，这为阐明该类药剂作用机制的研究奠定了基础。复合物III抑制剂的靶标蛋白

表 1 国际上已商品化的主要复合物 III 杀菌剂品种

Table 1 The main kinds of commercial complex III fungicides

杀菌剂 Fungicide	研发单位 Research institute	公布时间(年份) Announced date (year)	防治对象 Target pathogen
嘧菌酯 azoxystrobin	先正达 Syngenta	1992	绝大多数真菌和卵菌病害 Most fungal and oomycetes diseases
醚菌酯 kresoxim-methyl	巴斯夫 BASF	1992	白粉病、锈病、稻瘟病、霜霉病、炭疽病等 Powdery mildew, rust, rice blast, downy mildew, anthracnose, etc.
苯氧菌胺 metominostrobin	盐野义 Shionogi	1993	锈病、稻瘟病、白粉病、霜霉病 Rust, riceblast, powdery mildew, downy mildew
氟嘧菌酯 fluoxastrobin	拜耳 Bayer	1994	锈病、颖枯病、网斑病、白粉病、霜霉病等 Rust, glume blight, net blotch, powdery mildew, downy mildew, etc.
肟菌酯 trifloxystrobin	拜耳 Bayer	1998	白粉病、叶斑病、锈病、霜霉病、立枯病等 Powdery mildew, leaf spot, rust, downy mildew, damping off, etc.
噁唑菌酮 famoxadone	杜邦 Dupont	1997	白粉病、锈病、颖枯病、霜霉病、晚疫病等 Powdery mildew, rust, glume blight, downy mildew, late blight, etc.
啶氧菌酯 picoxystrobin	先正达 Syngenta	2000	叶枯病、叶锈病、颖枯病、褐斑病、白粉病等 Leaf blight, leaf rust, glume blight, brown patch, powdery mildew, etc.
醚菌胺 dimoxystrobin	巴斯夫 BASF	2001	立枯病、叶枯病、锈病和油菜霜霉病等 Damping off, leaf blight, rust, downy mildew of rape, etc.
咪唑菌酮 fenamidone	拜耳 Bayer	2002	霜霉病、疫病、黑斑病、褐腐病等 Downy mildew, blight, black spot, brown rot, etc.
肟醚菌胺 orysastrobin	巴斯夫 BASF	2006	稻瘟病和纹枯病 Rice blast, banded sclerotial blight
吡唑醚菌酯 pyraclostrobin	巴斯夫 BASF	2002	白粉病、霜霉病、叶斑病、菌核病、炭疽病等 Powdery mildew, downy mildew, leaf spot, sclerotinia, anthracnose, etc.
烯肟菌酯 enestroburin	沈阳化工研究院 Shenyang Chemical Institute	1997	霜霉病、白粉病、锈病、晚疫病等 Downy mildew, powdery mildew, rust, late blight, etc.
烯肟菌胺 fenaminstrobin	沈阳化工研究院 Shenyang Chemical Institute	1999	白粉病、纹枯病、稻瘟病、炭疽病等 Powdery mildew, banded sclerotial blight, rice blast, anthracnose, etc.
丁香菌酯 coumoxystrobin	沈阳化工研究院 Shenyang Chemical Institute	2003	苹果树腐烂病、稻瘟病、霜霉病、晚疫病、炭疽病、纹枯病等 Apple valsa canker, rice blast, downy mildew, late blight, anthracnose, banded sclerotial blight, etc.
唑菌酯 pyraoxystrobin	沈阳化工研究院 Shenyang Chemical Institute	2003	稻瘟病、纹枯病、赤霉病、锈病、霜霉病、疫霉病、白粉病等 Rice blast, banded sclerotial blight, *Fusarium* head blight, rust, downy mildew, blight, powdery mildew, etc.
苯醚菌酯 ZJ-0712	浙江省化工研究院 Shenyang Chemical Institute	2005	黄瓜白粉病、锈病、霜霉病、炭疽病等 Cucumber powdery mildew, rust, downy mildew, anthracnose, etc.
氰霜唑 cyazofamid	日本石原产业 Ishihara Industries	2001	霜霉病、疫病、根肿病，猝倒病等 Downy mildew, blight, clubroot, damping off, etc.
吲唑磺菌胺 amisulbrom	日本日产化学 Ishihara Industries	2003	霜霉病、疫病、黑胫病等 Downy mildew, blight, black shank, etc.
– fenpicoxamid	陶氏益农 Dow AgroSciences	2014	谷物叶枯病和锈病、香蕉黑条叶斑病等 Leaf spot and rust of grain, banana and plantain black leaf streak, etc.
唑嘧菌胺 ametoctradin	巴斯夫 BASF	2010	霜霉病、晚疫病等 Downy mildew, late blight, etc.

注："–"表示无正式中文名称。

Note: "–" means no official Chinese name.

由线粒体基因组中细胞色素 *b* 基因编码，2004 年 Esser 等[3] 基于抑制剂与复合物 III 的 Qo 口袋结合的晶体结构，测量异常信号和 FeS 蛋白的 2Fe-2S 簇还原势，以及 cd1 helix 上残基的结构变化，将复合物III抑制剂分为：P (positive) 型抑制剂，结合于 Qo 位点；N (negative) 型抑制剂，结合于 Qi 位点；PN 型抑制剂，与 Qo 和 Qi 位点都能结合。目前，FRAC 根据抑制剂在复合物III即线粒体细胞色素 *bc1* 复合体上作用位点的差异，将复合物III抑制剂分为 3 类：Qo 位点抑制剂、Qi 位点抑制剂和 QoSI 位点抑制剂。

2.1 QoI 类杀菌剂作用机制

QoI 类抑制剂作用于细胞色素 *bc1* 复合物中的线粒体内膜外壁 (Qo 位点)，抑制氢醌与 Qo 位点的结合并阻止复合物 III 中电子从细胞色素 *b* 传到细胞色素 *c1* 的传递，从而抑制病原菌 ATP 的产生[4, 8, 24]。基于 QoI 共同的活性结构、血红素 b_L 电子核磁共振波谱和 FeS 蛋白还原势的差异，又可

将 QoI 类杀菌剂进一步分为 3 类：第 1 类 (Ia 类) 含有甲氧基丙烯酸基团 (MOA) 或类似结构的抑制剂，该类杀菌剂亦称为 MOA 抑制剂；第 2 类 (Ib 类) 含有一个色酮基团，标桩菌素 (stigmatellin) 是这类的代表产品；第 3 类 (I 类) 为羟基醌类似物。其中 MOA 抑制剂能引起血红素 b_L 的可见光谱红移[25]；羟基醌抑制剂可以改变 FeS 蛋白的电子核磁共振波谱[26]；色酮抑制剂则对以上 2 种都有影响[27]。

Zhang 等[28] 于 1998 年解析了鸡、奶牛、兔子的细胞色素 *bc1* 的结构，以及抑制剂标桩菌素在该复合物醌氧化位点的结合形式，发现 FeS 蛋白作为酶的主要成分之一，其外部域存在两个位置：一个位置与假定的醌氧化位点很近，可使 FeS 蛋白被泛醌还原；另一个位置接近 cyt *c1*，可使 FeS 蛋白被 cyt *c* 氧化。该研究首次提出了线粒体细胞色素 *bc1* 的还原机制，即 FeS 蛋白外部域的移动使电子在泛醌和细胞色素 *bc1* 间穿梭。随后，Gao 等[24] 于 2003 年解析了牛心复合物 III 与噁唑菌酮结合的晶体结构，发现 cyt *b* 和 FeS 蛋白结构的变化，明确了前者在诱捕 FeS 蛋白过程中的作用以及控制 FeS 蛋白移动的可能信号转导机制 (图 2)。Esser 等[3] 于 2004 年以牛心线粒体 *bc1* 复合物为靶标，研究了其与嘧菌酯和标桩菌素等多个 QoI 的晶体结构，明确了其相互作用、结构变化以及可能的抗性机制，并提出通过 cyt *b* 残基和二级结构区分不同 QoI 的方法。Lancaster 等[29] 在 2007 年的研究结果表明，标桩菌素不仅能抑制酿酒酵母 *Sacchaeomyces cerevisiae* 细胞色素 bc1 复合体中醌的氧化，还可抑制光合细菌绿色红假单胞菌 *Rhodopseudomonas viridis* 中光合反应中心 (photochemical reaction center) 中醌的还原，标桩菌素通过其色酮相关侧链的自由旋转，分别与细胞色素 bc1 复合体和光反应中心蛋白结合来实现上述功能。

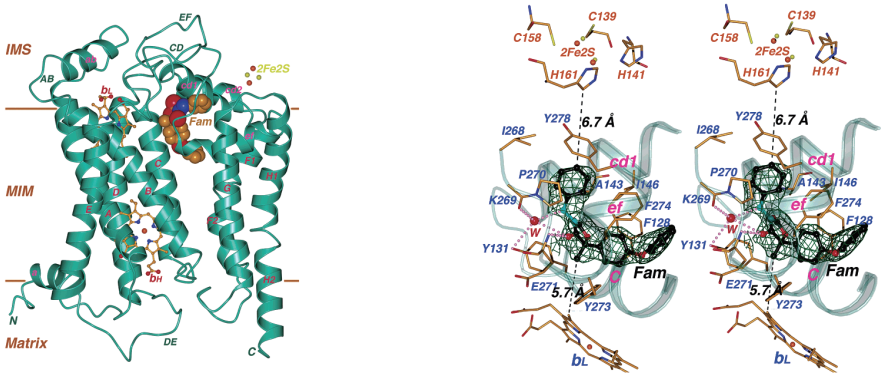


图 2　复合物 III cyt *b* 亚基 (a) 的结构及其 Qo 口袋 (b) 与噁唑菌酮的结合[24]

Fig. 2　Ribbon representation of the cyt *b* subunit structure with bound famoxadone (a) and stereopair of the famoxadone-binding environment in Qo pocket (b)[24]

周俞辛等[30] 于 2015 年采用牛心 cyt *bc1* 与嘧菌酯复合物作为原始晶体 (1SQB)，在 Sybel 7.3 工作站使用对接软件 Surflex-Dock (SFXC) 进行分子对接，获得了与原配体匹配较好的结合口袋，对接得分 11.75，RMS Deviation 为 0.665 5，并分别构建了中国创制的几种 QoI 杀菌剂 SYP-2815、烯肟菌胺、苯醚菌酯和烯肟菌酯与该口袋的结合模型。在 1SQB 晶体结构中，配体嘧菌酯结合于 Qo 口袋的疏水部分，芳香环之间的作用力和范德华力对药剂的结合起主要作用。甲氧基丙烯酸酯基团插入 C 螺旋的 Phe128 和 Tyr131，在甲氧基和 Glu271 之间形成氢键 (0.20 nm)，嘧啶环与 Phe274(0.48 nm) 形成 Ar-Ar 作用，甲氧基丙烯酸酯基团同样锲入 Phe128 和 Tyr131 之间，Ile146 上的 CG1 和嘧菌酯上的 O 距离为 0.31 nm (3.118 Å)。SYP-2815、烯肟菌胺、苯醚菌酯和烯肟菌酯分别与该结合口袋对接，除烯肟菌酯外，其他 3 种杀菌剂均与嘧菌酯匹配较好，4 种药剂同样和结合口袋存在上述氢键作用、Ar-Ar 作用以及范德华作用 (0.30~0.50 nm)，其中 SYP-2815 形成与结合口袋形成两个氢键。活性基团都锲入 Phe128 和 Tyr131 之间，侧链部分被 Phe274、Phe128、Ile146、Pro270、Ala277、Leu294、Met124 和 Ile298 包围，证明了 Qo 抑制剂结合腔 Qo 口袋的保守性，以及其与作用靶标结合模式的相似性。

2.2 QiI 类和 QioI 类杀菌剂作用机制

Qi 类抑制剂作用于细胞色素 *bc1* 复合物中的线粒体内膜内壁 (Qi 位点)，抑制血红素 b_H 到醌-半氢醌之间的电子传递[31]。抗霉素 A (antimycin A) 是最早用于科学研究的 Qi 位点抑制剂，而可用于农业生产的 QiI 类杀菌剂仅有 3 种，分别是氰霜唑、吲唑磺菌胺和 fenpicoxamid[15]。有关 QiI 类杀菌剂作用机制的研究较少，Mitani 等[32] 在 2001 年使用还原动力学方法，测定了氰霜唑对刺腐霉 *Pythium spinosum*cyt *b* 的影响，发现氰霜唑的作用机制与抗霉素 A 相似。因此，抗霉素 A 作用机制研究对阐释 QiI 类杀菌剂作用机制具有重要意义。1981 年 Jagow 等[33] 使用光谱学和还原动力学手段证明，抗霉素可以使 cyt *b* 中的 b_H 血红素发生红移，并推测抗霉素可能抑制 cyt *b* 到泛醌之间的电子传递。1998 年 Zhang 等[28] 使用来自鸡、奶牛和兔子心肌细胞的复合物 III 蛋白晶体，研究细胞色素 *bc1* 间的电子传递，发现抗霉素 A 结合位点与 b_H 血红素临近，被血红蛋白以及跨膜结构域 A、D、E 所包围。2005 年 Huang 等[31] 对牛的细胞色素 *bc1* 复合物晶体结构进行解析，结果显示：螺旋结构 A、E 通过 Leu43 与 Leu239(未显示) 间的范德华力以一定角度相连接，与其各自的 *β*-折叠一起构成 Qi 位点 (图 3a)；抗霉素 A 侧链与蛋白质上 228 位天冬氨酸 Asp 的羟基和氨基形成氢键，而甲酰胺基的氧则通过水分子与 227 位的赖氨酸 Lys 形成氢键 (图 3b)。

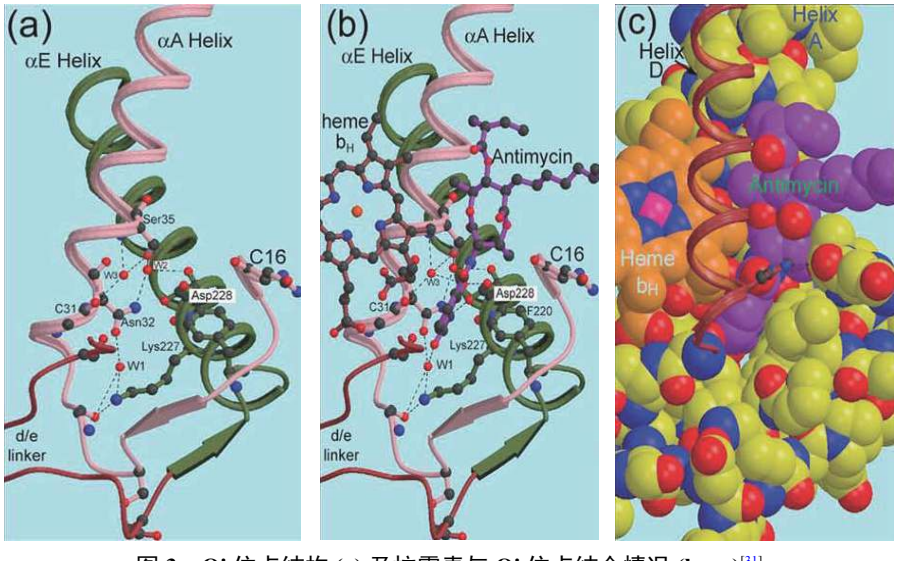


图 3 Qi 位点结构 (a) 及抗霉素与 Qi 位点结合情况 (b，c)[31]

Fig. 3 Qi site structure (a) and the binding of antimycin with Qi site(b, c)[31]

唑嘧菌胺是一类作用机制独特的复合物III抑制剂，可对病原卵菌的孢子囊形成、孢子囊萌发、游动孢子形成、释放、游动以及休止孢萌发等一系列高耗能过程进行抑制。Fehr 等[34] 使用纯化的 cyt *bc1* 复合体进行光谱学分析，并结合分子对接手段，证明唑嘧菌胺可以与 cyt *b* 上 Qo 位点结合，其结合模式与标桩菌素一致，FRAC 据此将该药剂归类为复合物III QoSI 位点抑制剂。Dreinert 等[6] 于 2018 年进一步研究表明，唑嘧菌胺是一种泛醌类似物，既可以与复合物III的 Qo 位点结合，也可以与 Qi 位点结合，其在 Qo 位点的结合方式与标桩菌素相同 (Qo-distal)，在 Qi 位点的结合方式与传统的 QiI 类杀菌剂如氰霜唑及吲唑磺菌胺存在差异，其中唑嘧菌胺在 Qi 位点主要与 cyt b 蛋白第 34 位丝氨酸结合形成氢键，而氰霜唑则在 Qi 位点与 228 位天冬氨酸结合，2 个氨基酸虽然位于同一药剂结合腔内，但其位置在结合腔相对的 2 个侧壁上，故唑嘧菌胺与氰霜唑之间无交互抗药性。且唑嘧菌胺在生物体内优先与 Qi 位点结合。因此，FRAC 在 2019 年将唑嘧菌胺归类为 QioI 类杀菌剂[22]。

2.3 抗性遗传机制

植物病原菌对杀菌剂的抗性是由遗传基因控制的，抗药基因位于细胞质遗传因子或细胞核染色体基因上。QoI 类杀菌剂作用于细胞色素 *bc1* 复合体，靶标蛋白 cyt *b* 位于线粒体基因组中，遗传方式上属于胞质遗传。线粒体遗传是一种非孟德尔遗传，但由于生物体的生物学特性存在差异，

两亲本对线粒体遗传的贡献也不相同。在存在明显性分化的生物体中，经过有性重组产生的后代线粒体基本来自母本，为母系遗传，常见于腐霉 (*Pythium*) 和疫霉 (*Phytophthora*)；若重组后代线粒体均来自父本，其遗传方式则为父系遗传，常见于异水霉属 (*Allomyces*) 等生物中[4,35]。在性分化不明显的生物中，仅以“+”和“−”对生物体进行区分，两种类型个体均可作为父本或母本，因此线粒体基因在该类生物后代的分离比理论上为 1 : 1，如小麦白粉病菌 *Blumeria graminis*[36]。QoI 类杀菌剂的抗性为母系遗传，因而 QoI 类杀菌剂抗性只有存在于母本中，才能随有性生殖遗传给后代。即如果母本是抗性的，其杂交后代中的抗感菌株分离模式比为 1 : 0；若父本是抗性的，在有性重组后，抗性丧失，但线粒体遗传同样会受到父本线粒体基因与核基因遗传的影响。在葡萄霜霉病菌 *Plasmopara viticola* 的研究中，对 QoI 类药剂敏感和抗性菌株杂交后有性后代抗性敏感分离比为 8 : 23[37]，作者推测有性生殖重组过程中的异常现象可能导致了葡萄霜霉病菌异常的分离模式[38]。

线粒体基因大多是单个存在的，不具备核基因的突变修复机制，具有较高的突变频率。因此，病原菌在接触复合物III抑制剂后，很容易发生基因突变并产生抗药性，且该类抗药性同样可以稳定地遗传给后代。但也有研究表明，病原菌对 QoI 类药剂产生抗性后，抗性菌株或突变体的适合度会有明显的降低[34]。田间出现 QoI 类杀菌剂的抗性群体后，停止施用 QoI 类杀菌剂几年，病原菌的抗性群体在种群中所占的比例会逐渐降低[8]。目前尚未见 QiI 类和 QioI 类杀菌剂抗性遗传方面的系统报道。

3 抗性分子机制

关于复合物 III 抑制剂的抗性分子机制研究主要集中在 QoI 类杀菌剂上，近年来 QioI 类杀菌剂的抗性分子机制也有了相关报道，但有关 QiI 类杀菌剂的抗性分子机制报道较少，具体包括以下 3 类。

3.1 靶标位点氨基酸取代

在 QoI 类杀菌剂开发和使用早期，对其固有抗性风险研究认为该类杀菌剂属于中等抗药性风险。但实际上，这类杀菌剂在田间应用 2 年后，就产生了严重的抗药性并导致田间防治效果显著下降。截至 2018 年 5 月，FRAC 统计数据表明，全球范围内在田间对 QoI 类药剂产生抗药性的病原菌共有 61 例，故 FRAC 也将 QoI 类杀菌剂定义为“高抗性风险杀菌剂”[22]。关于 QoI 类杀菌剂的抗性机制，早在 1998 年就有学者开始了研究工作，结果表明，其抗性机制主要是 cyt *b* 基因发生点突变，导致其对应的氨基酸发生变化，致使蛋白空间构象发生变化从而阻止药剂的结合[39-40]。Sierotzki 等[41] 通过紫外诱导香蕉黑斑病菌 *Mycosphaerella fijensis*，获得系列抗药性突变体，这些突变体对 QoI 类药剂产生抗性的原因主要与 cyt *b* 蛋白的 127~147 位和 275~296 位间的氨基酸区域有关，不同的突变位点显示不同的抗性水平，其中 127~147 位为高抗突变区域。

在田间检测到对 QoI 产生抗性的植物病原菌中，主要发现在 cyt *b* 蛋白上存在 2 种突变类型即 G143A 和 F129L，且 G143A 引起的抗性水平高于 F129L[42-43]。其中，G143A 点突变的报道最为频繁，即 cyt *b* 蛋白的 143 位甘氨酸被丙氨酸取代，该突变位点在很多病原菌的 QoI 抗性菌株中均有报道，包括小麦白粉病菌、葡萄霜霉病菌、大豆灰斑病菌 *Cercosporidium sofinum*、稻瘟病菌 *Pyricularia oryzae*、香蕉黑条叶斑病菌 *Pseudocercospora fijiensis*、草坪灰斑病菌 *Pyricularia grisea*、西瓜蔓枯病菌 *Mycosphaerlla melonis* 和灰霉病菌 *Botrytis cinerea* 等[44-51]。在对 QoI 产生抗性的瓜果腐霉病菌 *Pythium aphanidermatum*、早疫病菌 *Altemaria solani*、葡萄霜霉病菌、网斑病菌 *Pyrenophora* 亚洲大豆锈病菌 *Phakopsora pachyrhizi* 和马铃薯丝核菌 *Rhizoctonia solani* 等病原菌中发现 cyt *b* 蛋白 129 位 (F129L) 上苯丙氨酸被亮氨酸取代[52-56]。此外，根据 FRAC 的报道，还有一个位点即 G137R 仅在小麦黄斑叶枯病 *Pyrenophora tritici-repentis* 等少数病原菌中出现[22]。在荔枝霜疫霉 *Peronophythora litchii* 对烯肟菌酯、烯肟菌胺、丁香菌酯、氯啶菌酯和苯嘧菌酯的抗性分子机制研究中，发现除 cyt *b* 常见的 2 个位点可以引起对供试药剂产生抗性外，Y131C 也能够引起荔枝霜疫霉对上述 5 种药剂产生上百倍的抗性水平，而该抗性位点是首次被报道[30]。迄今，未见锈菌 *Pyrenophora* G143A 点突变对 QoI 类杀菌剂产生抗性的报道，锈菌 cyt *b* 基因第 143 位密码子之后有 1 个内含子，该位点突变可影响其 mRNA 的剪切，导致突变体无法存活，因此仅有 F129L 突变类型的低水平抗性菌株，该药剂在田间对锈菌仍具有较高的防效[57]。灰霉病对该类药剂的抗药性研究也表明，田间灰霉病菌中存在 2 种类型的

cyt *b* 基因：一类是在第 143 位密码子后具有内含子；另一类是在第 143 位密码子后没有内含子。因此，田间灰霉病菌对 QoI 药剂产生抗性主要为 cyt *b* 基因第 143 位密码子后不含内含子的类型，其突变类型为 G143A[58-61]。

有关上述突变位点与病原菌抗药性的关系，不同学者对此进行了研究和解析。Esser 等[3] 研究了牛心 cyt *bc1* 复合物与 QoI 类抑制剂如嘧菌酯等的相互作用，以及与药剂结合后复合物结构的变化，同时从空间结构方面解释了 G143A 和 F129L 2 个突变位点对嘧菌酯产生抗性的原因。晶体学研究表明，牛心 Phe128(相当于病原菌 129 位) 位于 azoxystrobin 结合的中心位置，与甲氧基丙烯酸酯基团以及连接苯基和嘧啶的氧原子接触，距离分别是 0.30 nm 和 0.36 nm，Phe128 庞大的苯基通过范德华力支持甲氧基丙烯酸酯基团，利用 Ar-Ar 作用力稳定嘧啶环，一旦 128 位苯丙氨酸被其他氨基酸代替，两种作用力都会消失；而 Gly142 (相当于病原菌 143 位) 被丙氨酸 (Ala) 替代后，因 Ala 体积较 Gly 大，产生空间位阻影响与嘧菌酯的结合，却不会影响醌的正常氧化，这同样解释了在很多植物的 cyt *b* 蛋白中发现 Gly142 被 Ala 取代，但嘧菌酯并不影响植物的正常生长。Rajagukguk[61] 研究发现，球形红细菌 *Rhodobacter sphaeroides* 的 cyt *b* 的 EF loop 区 (275-296 位氨基酸) 突变影响 FeS 蛋白 ISP 从 cyt *b* 的释放和吸收。

周俞辛等[30] 对细胞色素 *bc1* 复合物与多种含甲氧基丙烯酸酯活性基团 (MOA) 的抑制剂结合的复合物进行结构解析，发现 MOA 与 Qo 位点结合的部分构造十分保守，Qo 结合腔相关的氨基酸位于 cyt *b* 蛋白的 120-150 及 260-270 区域，是一个高度的疏水区域。通过同源性比对，采用与荔枝霜疫霉在 Qo 区域同源性较高的牛心 cyt *bc1* 复合物晶体结构进行创制性 QoI 类杀菌剂的分子对接研究，分析与抗药性相关的 3 个氨基酸 Gly142、Tyr131 和 Phe128 与药剂的相互作用。结果显示，由于甘氨酸体积很小，Gly142 与药剂分子表面形成凹陷，空间位阻小，将 142 位突变为丝氨酸 (Ser) 或丙氨酸 (Ala) 后，G142A 和 G142S 与药剂分子表面形成凸起，空间位阻明显变大，影响药剂的结合。这与 Esser 等[3] 对小麦白粉病菌 *E. graminis* 的 G143A 突变与嘧菌酯水平关系的解释一致。对于突变体 Y131C，研究发现药剂的活性基团锲入 Phe128 和 Tyr131 之间，对于药剂结合的稳定性起一定作用，Tyr131 上的苯环与各个药剂活性基团中离其较近的氧原子存在 π 作用，将 131 位氨基酸突变为半胱氨酸 (Cys) 后，蛋白和药剂间的 π 作用消失，从而影响药剂的结合；此外，由于突变后各药剂与活性口袋结合的构象发生变化，与原口袋腔之间存在的作用力包括氢键、Ar-Ar 作用以及范德华力明显减弱，导致各药剂与该突变体的结合能减弱[30]。对于突变体 F128S，Phe128 上的苯环与药剂活性基团上的甲基存在一定的疏水作用以稳定药剂的结合，一旦突变为丝氨酸 (Ser)，苯环缺失，疏水作用明显减弱，与 F128S 对接后各药剂构象发生变化，与原口袋腔之间的作用力相应改变，活性测定结果显示 F128S 对烯肟菌胺高抗，其抗性指数大于 500 倍以上，对于其他几种药剂为低到中抗，进一步分子对接结果也表明，F128S 与烯肟菌胺的对接得分最低，即结合能最低，结合作用最差，表明活性测定和对接结果吻合[30]。综上所述，Gly142、Tyr131、Phe128 是对供试 QoI 类药剂抗性相关的关键氨基酸，当其发生突变后，原来的氨基酸与药剂之间的作用力缺失，药剂分子的结合构象改变，同时相应的作用力变弱或消失，从而使药剂与口袋腔结合变弱，最终导致菌体对药剂产生抗性。对于不同的突变体，由于药剂自身结构的差异及与口袋腔作用力变化强弱的程度不同导致对不同的药剂产生不相同的抗性水平[29]。

QiI 类杀菌剂抗性机制的研究未见报道，由于其作用机制与 Qi 抑制剂抗霉素 A 相似，本文从抗霉素 A 抗性机制方面进行阐释。Qi 抑制剂抗性的报道始见于 1998 年，Rago 等[62] 对酿酒酵母抗霉素突变体进行研究的结果显示，37 位甘氨酸突变为缬氨酸 (G37V) 与抗霉素抗性直接相关，228 位赖氨酸突变为异亮氨酸 (L228I) 同样可以引起该抑制剂的抗性，其中 G37V 为主要抗性类型。2008 年 Kousik 等[63] 报道了在田间发现部分辣椒疫霉 *Phytophthora capsici* 对氰霜唑不敏感的现象，但并未对其抗性机制进行探讨。

QioI 类杀菌剂抗性机制方面的研究也相对较少，2018 年 Mounkoro 等[64] 使用唑嘧菌胺敏感型酵母突变菌株，对唑嘧菌胺的结合位点进行解析，发现 cyt *b* 蛋白上第 34 位丝氨酸突变为赖氨酸 (S34L) 与唑嘧菌胺抗性直接相关。Fontaine 等[65] 于 2019 年报道在田间葡萄霜霉病菌抗唑嘧菌胺的菌株中检测到 S34L 的氨基酸突变。

3.2 旁路氧化途径

旁路氧化途径最初发现于植物体内，简称为交替途径 (alternative pathway，AP)，后来该途径也在病原菌中发现，并成为病原菌对 QoI 类杀菌剂产生抗药性的原因之一[66]。交替氧化酶 (alternative oxidase，AOX) 是该过程的关键酶，能接受 CoQ 传来的电子直接传递给氧生成水，而不经过复合物Ⅲ和复合物Ⅳ，整个旁路氧化途径产生 ATP 的效率在 40% 左右，可供细胞新陈代谢使用[67-69]。*AOX* 基因在不同病原菌中的表达形式不相同，在多数病原菌如稻瘟病菌、小麦叶枯病菌 *Septoria tritici* 和粗糙脉孢霉 *Neurospora crassa*中，其表达方式为诱导表达型，即正常条件下该基因水平很低或不能被检测到，但是当以细胞色素介导的呼吸途径被阻断或线粒体蛋白合成受抑制，其被诱导表达产生大量的酶；而在其他一些病原菌如番茄灰霉病菌和小麦全蚀病菌 *Gaeumanomyces graminis* 中，该基因则是组成型表达的，通常这种病原菌对 QoI 类杀菌剂的敏感性较差[4, 69]。

QoI 类杀菌剂因 *AOX* 基因被诱导表达产生抗药性也有较多报道，如 1997 年 Ziogas 等[70] 在室内通过紫外诱变获得小麦叶枯病菌抗嘧菌酯突变体，突变体的抗性倍数为 10，但在 2 mmol/L 的 SHAM (SHAM 为一种 AOX 酶抑制剂) 条件下，其对嘧菌酯重新表现敏感。该结果表明，小麦叶枯病菌对嘧菌酯的抗药性是由 *AOX* 基因过表达引起的。2000 年 Sierotzki 等[41] 在田间获得香蕉黑条叶斑病菌对 QoI 类杀菌剂抗性菌株，并检测到部分抗性菌株的 *AOX* 基因表达量上调。王海强等[8] 于 2009 年对 7 种 QoI 类杀菌剂的相关研究表明，供试的 QoI 类药剂均可诱导水稻稻瘟病菌 *AOX* 基因过量表达从而启动旁路氧化途径，表现抗药性。Fontaine 等[65] 监测葡萄霜霉病菌对 QiI 类杀菌剂吲唑磺菌胺的抗性，从 2012 年起每年均可检测到因 *AOX* 基因上调表达引起的抗性菌株，且该类抗性菌株的频率逐年上升。有研究表明，*AOX* 基因过量表达的突变体表现出较弱的竞争力，将葡萄霜霉病菌的该类突变体与敏感菌株孢子囊混合后，在无药剂条件下培养 8 代，发现 *AOX* 过表达突变体的孢子囊在群体中所占比例急剧下降[34]。然而，QoI 类杀菌剂诱导 *AOX* 的过量表达仍是该类杀菌剂抗性产生的一个重要原因。

3.3 运输体机制

运输体是一类位于病原菌细胞膜上的蛋白结构，可以阻止病原菌细胞内的毒性物质富集达到致死药剂浓度[71]。ABC (ATP-binding cassette) 和 MFS (major facilitator superfamily) 运输体是最具代表性的保护病原菌免受杀菌剂侵害的两类运输体[72-73]。研究者首次检测到 ABC 运输体与 QoI 类杀菌剂抗性关联的情况是在构巢曲霉 *Aspergillus nidulans* 中，指出由 *AtrB* 基因编码的 ABC 运输体可以保护病原菌免受几乎所有种类杀菌剂的侵害，包括 QoI 类杀菌剂[74]。同时有研究表明，小麦叶斑病原菌 *Mycosphaerella graminicola* 对 QoI 类杀菌剂产生抗性与 MFS 运输体有关[75]。此外，有研究者在室内获得了具有多药抗药性的马铃薯晚疫病原菌 *Phytophthora infestans* 突变体，虽然关于突变体的抗药性分子机制并未探明，但是运输体的过量表达被认为是最有可能的抗性机制[76]。

4 结论及展望

复合物Ⅲ抑制剂包含 QoI、QiI 和 QioI 类杀菌剂 3 类，其中 QoI 种类较多，在杀菌剂的发展历程中发挥着重要作用。由于 QoI 类杀菌剂作用位点单一，上市后不久便产生抗性问题，为了延缓其抗药性的发生，减少用药次数、交替用药以及将该类杀菌剂与其他作用位点不同的杀菌剂复配使用等都已成为农业生产中常用的抗性治理的有效措施。对 QoI 类杀菌剂产生抗性的卵菌，仍对 QiI 类杀菌剂氰霜唑敏感，所以氰霜唑等 QiI 类杀菌剂可作为 QoI 类杀菌剂的复配药剂用于抗性治理。此外，QoI 类杀菌剂的主要防治对象马铃薯晚疫病菌目前也检出抗性菌株，而锈菌中并未发现 QoI 类杀菌剂的高水平抗性菌株，因此该类杀菌剂还可以继续用于这些病原菌的田间防治。

QoI 类杀菌剂的抗性分子机制主要是由 cyt *b* 蛋白的 G143A 和 F129 L 点突变引起，这为建立该类杀菌剂快速有效的抗性分子检测方法以及制定抗性治理策略提供了重要的理论基础。目前已有实时定量 PCR (Real time PCR)、酶切扩增多态性 (Cleaved amplified polymorphisms, CAPS)、等位基因特异性 PCR (Allele-specific PCR, ASPCR) 等方法不断运用到 QoI 类杀菌剂抗性菌株的分子检测中，而上述的检测方法均需要精密的仪器，对于规模较小的实验室及一些基层单位，这些方法还是不能得到有效的推广及田间应用[58-59,77]。近些年，环介导等温扩增技术 (Loop-mediated isothermal amplification method, LAMP) 的发展似乎能够解决

上述方法的局限性，基于 Bst DNA 聚合酶建立的 LAMP 技术具有操作简便、灵敏度高、特异性强等优点，已成功运用到多种病原菌的抗性检测中，在复合物Ⅲ抑制剂的抗性检测中具有良好的应用前景[78-79]。

随着对复合物Ⅲ结构和功能的不断认识，以及对其抑制作用机理的深入了解，一些结构新颖、活性突出的抑制剂不断被开发出来。其中，QoI 类杀菌剂是以具农药活性的天然源物质为起点，经构效关系分析、结构修饰改造后衍生发展的一类杀菌剂，这也是未来创制新型农药的有效途径。随着分子生物学的进一步发展, 如多种组学联用、蛋白结构生物学解析、病原菌遗传操作方法的建立优化等，对复合物Ⅲ抑制剂的作用靶标研究将会进一步完善，更加明确该类化合物与靶标大分子之间的结合位点以及二者相互作用的空间构象，进一步为先导化合物的结构优化提供思路，从而设计合成出更多安全、高效的杀菌剂。

作者简介：

张灿，女，2012—2017 年在中国农业大学植物病理学系学习，先后获硕士及博士学位；现为中国农业大学博士后。主要研究方向为植物病原菌抗药性分子机制及卵菌基因功能研究。

高续恒，男，2015—2018 年在四川大学学习，获硕士学位；2018.09-至今，为西北农林科技大学博士研究生。研究方向为植物病原菌抗药性研究。

刘西莉，女，教授，博士生导师。1991 年毕业于北京农业大学应用化学系并留校工作。2004 年获得中国农业大学植物病理系博士学位；2005 — 2006 年在丹麦哥本哈根大学植物科学系作访问学者；2007—2017 年，为中国农业大学植物病理系教授；2017 年至今，任西北农林科技大学“教育部长江学者奖励计划”特聘教授。重点围绕“植物病原菌与杀菌剂互作的分子基础与病害控制技术”进行科学研究，主要研究方向：1）卵菌重要基因功能研究及药物潜在分子靶标发掘；2）植物病原菌与杀菌剂互作的分子基础；3）植物病原菌抗药性风险评估及抗性治理；4）主要农作物风险性种传、土传病害诊断和防控技术。曾先后获国家“科学技术进步二等奖”3 项、国家“万人计划”领军人才、农业部“农业科研杰出人才以及创新团队”及科技部“中青年科技创新领军人才”等称号。现任《农药学学报》副主编。

参考文献 (References):

[1] SARASTE M. Oxidative phosphorylation at the *fin de siècle*[J]. Science, 1999, 283(5407): 1488-1493.

[2] RICH P R, MARÉCHAL A. The mitochondrial respiratory chain[J]. Essays Biochem, 2010, 47: 1-23.

[3] ESSER L, QUINN B, LI Y F, et al. Crystallographic studies of quinol oxidation site inhibitors: a modified classification of inhibitors for the cytochrome *bc1* complex[J]. J Mol Biol, 2004, 341(1): 281-302.

[4] GISI U, SIEROTZKI H, COOK A, et al. Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides[J]. Pest Manag Sci, 2002, 58(9): 859-867.

[5] ISAMU Y, MAKOTO F. Recent topics on action mechanisms of fungicides[J]. J Pestic Sci, 2005, 30(2): 67-74.

[6] DREINERT A, WOLF A, MENTZEL T, et al. The cytochrome *bc1* complex inhibitor ametoctradin has an unusual binding mode[J]. Biochim Et Biophys Acta BBA-Bioenerg, 2018, 1859(8): 567-576.

[7] FEHR M, ZITO R, MEYER L, et al. The mitochondrial complex III inhibitor ametoctradin has an unusual binding mode[C]. 19th International Reinhardsbrunn Symposium-Modern Fungicides and Antifungal Compounds. Friedrichroda, Germany. 7th-11th April, 2019.

[8] 王海强. 六种QoI类杀菌剂的抑菌活性、吸收传导及抗药性机制研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2009.
WANG H Q. Study on the antifungal activity, uptake and transportation and resistance mechanisms of six QoI fungicides[D]. Beijing: China Agricultural University, 2009.

[9] MUSILEK V, ČERNÁJ, ŠAŠEK V, et al. Antifungal antibiotic of the basidiomycete *Oudemansiella mucida*[J]. Folia microbiol, 1969, 14(4): 377.

[10] ANKE T, OBERWINKLER F, STEGLICH W, et al. The strobilurins-new antifungal antibiotics from the basidiomycete *Strobilurus tenacellus* (PERS. ex FR.) SING[J]. J antibiot, 1977, 30(10): 806-810.

[11] GERTH K, IRSCHIK H, REICHENBACH H, et al. Myxothiazol, an antibiotic from *Myxococcus fulvus* (myxobacterales). I. Cultivation, isolation, physico-chemical and biological properties[J]. J antibiot, 1980, 33(12): 1474-1479.

[12] BECKER W F, JAGOW G V, ANKE T, et al. Oudemansin, strobilurin A, strobilurin B and myxothiazol: new inhibitors of the *bc1* segment of the respiratory chain with an *E*-*β*-methoxyacrylate system as common structural element[J]. FEBS Lett, 1981, 132(2): 329-333.

[13] 关爱莹, 胡耐冬, 刘长令. Strobilurin类杀菌剂[J]. 世界农药, 2002, 24(2): 16-19.
GUAN A Y, HU N D, LIU C L. Strobilurin pesticides[J]. World Pestic, 2002, 24(2): 16-19.

[14] 柳爱平. Strobilurin类生物活性化合物的研究与开发新进展[J]. 精细化工中间体, 2003, 33(2): 1-5, 64.
LIU A P. Progress in both research and development of strobilurin

compounds[J]. Fine Chem Intermed, 2003, 33(2): 1-5, 64.

[15] FRAC. Classification of fungicides[EB/OL].[2019]. https://www.frac.info/publications.

[16] 刘长令. 世界农药大全(杀菌剂卷)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 117-149.
LIU C L. The world pesticide encyclopedia (Fungicide)[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2006: 117-149.

[17] 柏亚罗. Strobilurins类杀菌剂研究开发进展[J]. 农药, 2007, 46(5): 289-295.
BAI Y L. The progresses of research and development on strobilurin fungicides[J]. Agrochemicals, 2007, 46(5): 289-295.

[18] 骆焱平, 李元祥, 赵培亮, 等. 甲氧丙烯酸酯类杀菌剂的研究进展[J]. 中国科技论文在线, 2006, 1(1): 20-26.
LUO Y P, LI Y X, ZHAO P L, et al. Research progress on the fungicidal strobilurin derivatives[J]. Sci Online, 2006, 1(1): 20-26.

[19] 李志念, 王柯. 防治卵菌纲植物病害的新型杀菌剂氰霜唑(cyazofamid)[J]. 农药, 2002, 41: 46-47.
LI Z N, WANG K. A new fungicide to prevent and control oomycetes plant diseases-cyazofamid[J]. Pesticides, 2002, 41: 46-47.

[20] MITANI S, ARAKI S, YAMAGUCHI T, et al. Antifungal activity of the novel fungicide cyazofamid against *Phytophthora infestans* and other plant pathogenic fungi *in vtro*[J]. Pestic Biochem Physiol, 2001, 70(2): 92-99.

[21] Andy Beer. 2016年全球登记或上市的49种新农药[J]. 农药市场信息, 2016(29): 48-49.
Andy Beer. 49 new pesticides registered or listed globally in 2016[J]. Pestic Market Inform, 2016(29): 48-49.

[22] FRAC. List of plant pathogenic organisms resistant to disease control agents[EB/OL].[2018-05]. https://www.frac.info/publications.

[23] IWATA S. Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome *bc1* complex[J]. Science, 1998, 281(5373): 64-71.

[24] GAO X G, WEN X L, YU C A, et al. The crystal structure of mitochondrial cytochrome *bc1* in complex with famoxadone: the role of aromatic–aromatic interaction in inhibition[J]. Biochemistry, 2002, 41(39): 11692-11702.

[25] BRANDT U, SCHAGGER H, JAGOW G. Characterisation of binding of the methoxyacrylate inhibitors to mitochondrial cytochrome *c* reductase[J]. Eur J Biochem, 1988, 173(3): 499-506.

[26] BOWYER J R, EDWARDS C A, OHNISHI T, et al. An analogue of ubiquinone which inhibits respiration by binding to the iron-sulfur protein of the cytochrome *bc1* segment of the mitochondrial respiratory chain[J]. J Biol Chem, 1982, 257(14): 8321-8330.

[27] OHNISHI T, BRANDT U, JAGOW G. Studies on the effect of stigmatellin derivative on cytochrome band the Rieske iron - sulfur cluster of cytochrome *c* reductase from bovine heart mitochondria[J]. Eur J Biochem, 1988, 176(2): 385-389.

[28] ZHANG Z L, HUANG L, SHULMEISTER V M, et al. Electron transfer by domain movement in cytochrome *bc1*[J]. Nature, 1998, 392(6677): 677-684.

[29] LANCASTER C R D, HUNTE C, KELLEY J III, et al. A comparison of stigmatellin conformations, free and bound to the photosynthetic reaction center and the cytochrome *bc1* complex[J]. J Mol Biol, 2007, 368(1): 197-208.

[30] ZHOU Y X, CHEN L, HU J, et al. Resistance mechanisms and molecular docking studies of four novel QoI fungicides in *Peronophythora litchii*[J]. Sci Rep, 2015, 5: 17466.

[31] HUANG L S, COBESSI D, TUNG E Y, et al. Binding of the respiratory chain inhibitor antimycin to the mitochondrial bc_1 complex: a new crystal structure reveals an altered intramolecular hydrogen-bonding pattern[J]. J Mol Biol, 2005, 351(3): 573-597.

[32] MITANI S, ARAKI S, TAKII Y, et al. The biochemical mode of action of the novel selective fungicide cyazofamid: specific inhibition of mitochondrial complex III in *Phythium spinosum*[J]. Pestic Biochem Physiol, 2001, 71(2): 107-115.

[33] JAGOW G V, ENGEL W D. Complete inhibition of electron transfer from ubiquinol to cytochrome *b* by the combined action of antimycin and myxothiazol[J]. FEBS Lett, 1981, 136(1): 19-24.

[34] FEHR M, WOLF A, STAMMLER G. Binding of the respiratory chain inhibitor ametoctradin to the mitochondrial *bc1* complex[J]. Pest Manag Sci, 2016, 72(3): 591-602.

[35] BIRKY C W. Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: mechanisms and evolution[J]. Proc Natl Acad Sci, 1995, 92(25): 11331-11338.

[36] ROBINSON H L, RIDOUT C J, SIEROTZKI H, et al. Isogamous, hermaphroditic inheritance of mitochondrion-encoded resistance to Qo inhibitor fungicides in *Blumeria graminis* f. sp. tritici[J]. Fungal Genet Biol, 2002, 36(2): 98-106.

[37] DEHNE H W, DEISING H B, GISI U, et al. Modern fungicides and antifungal compounds V[M]. Germany Friedrichroda, 2008: 101-104.

[38] JUDELSON H S. Expression and inheritance of sexual preference and selfing potential in *Phytophthora infestans*[J]. Fungal Genet Biol, 1997, 21(2): 188-197.

[39] GISI U, CHIN K M, KNAPOVA G, et al. Recent developments in elucidating modes of resistance to phenylamide, DMI and strobilurin fungicides[J]. Crop Prot, 2000, 19(8-10): 863-872.

[40] FERNÁNDEZ-ORTUÑO D, TORÉS J A, VICENTE A D, et al. Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi[J]. Int Microbiol, 2008, 11: 1-9.

[41] SIEROTZKI H, PARISI S, STEINFELD U, et al. Mode of resistance to respiration inhibitors at the cytochrome *bc1* enzyme complex of *Mycosphaerella fijensis* field isolates[J]. Pest Manag Sci, 2000, 56(10): 833-841.

[42] FISHER N, MEUNIER B. Molecular basis of resistance to cytochrome *bc1* inhibitors[J]. FEMS Yeast Res, 2008, 8(2): 183-192.

[43] SIEROTZKI H, WULLSCHLEGER J, GISI U. Point mutation in cytochromebgene conferring resistance to strobilurin fungicides in *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*field isolates[J]. Pestic Biochem Physiol, 2000, 68(2): 107-112.

[44] BARDAS G A, VELOUKAS T, KOUTITA O, et al. Multiple resistance of *Botrytis cinerea* from kiwifruit to SDHIs, QoIs and fungicides of other chemical groups[J]. Pest Manag Sci, 2010, 66(9): 967-973.

[45] GISI U, SIEROTZKI H. Fungicide modes of action and resistance in downy mildews[J]. Eur J Plant Pathol, 2008, 122(1): 157-167.

[46] GRASSO V, PALERMO S, SIEROTZKI H, et al. Cytochrome *b* gene structure and consequences for resistance to Qo inhibitor fungicides in plant pathogens[J]. Pest Manag Sci, 2006, 62(6): 465-472.

[47] ISHII H, FRAAIJE B A, SUGIYAMA T, et al. Occurrence and molecular characterization of strobilurin resistance in cucumber powdery mildew and downy mildew[J]. Phytopathology, 2001, 91(12): 1166-1171.

[48] KIM Y S, DIXON E W, VINCELLI P, et al. Field resistance to strobilurin(QoI) fungicides in *Pyricularia grisea* caused by mutations in the mitochondrial cytochrome *b* gene[J]. Phytopathology, 2003, 93(7): 891-900.

[49] PRICE P P III, PURVIS M A, CAI G H, et al. Fungicide resistance in *Cercospora kikuchii*, a soybean pathogen[J]. Plant Dis, 2015, 99(11): 1596-1603.

[50] STANDISH J R, TOMASO-PETERSON M. Occurrence of QoI gungicide resistance in *Cercospora sojina* from Mississippi soybean[J]. Plant Dis, 2015, 99(10): 1347-1352.

[51] CASTROAGUDÍN V L, CERESINI P C, OLIVEIRA S C, et al.

Resistance to QoI fungicides is widespread in Brazilian populations of the wheat blast pathogen *Magnaporthe oryzae*[J]. Phytopathology, 2015, 105(3): 284-294.

[52] KLOSOWSKI A C, MAY DE MIO L L, MIESSNER S, et al. Detection of the F129L mutation in the cytochrome *b* gene in *Phakopsora pachyrhizi*[J]. Pest Manag Sci, 2016, 72(6): 1211-1215.

[53] DJÉBALI N, ELKAHOUI S, TAAMALLI W, et al. Tunisian *Rhizoctonia solani* AG3 strains affect potato shoot macronutrients content, infect *Faba* bean plants and show *in vitro* resistance to azoxystrobin[J]. Australas Plant Pathol, 2014, 43(3): 347-358.

[54] PASCHE J S, PICHE L M, GUDMESTAD N C. Effect of the F129L mutation in *Alternaria solani* on fungicides affecting mitochondrial respiration[J]. Plant Dis, 2005, 89(3): 269-278.

[55] PASCHE J S, WHARAM C M, GUDMESTAD N C. Shift in sensitivity of *Alternaria solani* in response to QoI fungicides[J]. Plant Dis, 2004, 88(2): 181-187.

[56] SEMAR M, STROBEL D, KOCH A, et al. Field efficacy of pyraclostrobin against populations of *Pyrenophora teres* containing the F129L mutation in the cytochrome *b* gene[J]. J Plant Dis Prot, 2007, 114(3): 117-119.

[57] SIEROTZKI H, FREY R, WULLSCHLEGER J, et al. Cytochrome *b*gene sequence and structure of *Pyrenophora teres* and *P. triticirepentis* and implications for QoI resistance[J]. Pest Manag Sci, 2007, 63: 225-233.

[58] BANNO S, YAMASHITA K, FUKUMORI F, et al. Characterization of QoI resistance in *Botrytis cinerea* and identification of two types of mitochondrial cytochrome *b* gene[J]. Plant Pathol, 2009, 58(1): 120-129.

[59] JIANG J H, DING L S, MICHAILIDES T J, et al. Molecular characterization of field azoxystrobin - resistant isolates of *Botrytis cinerea*[J]. Pestic Biochem Physiol, 2009, 93(2): 72-76.

[60] LEROUX P, GREDT M, LEROCH M, et al. Exploring mechanisms of resistance to respiratory inhibitors in field strains of *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mold[J]. Appl Environ Microbiol, 2010, 76(19): 6615-6630.

[61] RAJAGUKGUK S, YANG S Q, YU C A, et al. Effect of mutations in the cytochrome *b* ef loop on the electron-transfer reactions of the rieske iron–sulfur protein in the cytochrome *bc1* complex[J]. Bichemistry, 2007, 46(7): 1791-1798.

[62] DI RAGO J P, COLSON A M. Molecular basis for resistance to antimycin and diuron, Q-cycle inhibitors acting at the Qi site in the mitochondrial ubiquinol-cytochrome *c* reductase in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. J Biol Chem, 1988, 263(25): 12564-12570.

[63] KOUSIK C S, KEINATH A P. First report of insensitivity to cyazofamid among isolates of *Phytophthora capsici* from the southeastern United States[J]. Plant Dis, 2008, 92(6): 979.

[64] MOUNKORO P, MICHEL T, BENHACHEMI R, et al. Mitochondrial complex III Qi-site inhibitor resistance mutations found in laboratory selected mutants and field isolates[J]. Pest Manag Sci, 2018, 75(8): 2107-2114.

[65] FONTAINE S, REMUSON F, CADDOUX L, et al. Investigation of the sensitivity of *Plasmopara viticola* to amisulbrom and ametoctradin in French vineyards using bioassays and molecular tools[J]. Pest Manag Sci, 2019, 75(8): 2115-2123.

[66] 贾俊超, 马琳, 范志金, 等. 病原菌对Strobilurin类杀菌剂抗药性机理的研究进展[J]. 农药学学报, 2008, 10(1): 1-9.
JIA J C, MA L, FAN Z J, et al. Progress on study of resistance mechanism of strobilurin fungicides[J]. Chin J Pestic Sci, 2008, 10(1): 1-9.

[67] LAMBOWITZA M, SLAYMAN C W. Cyanide resistant respiration in *Neurospora crassa*[J]. J Bacteriol, 1971, 108(3): 1087-1096.

[68] JOSEPH-HORNE T, HOLLOMON D W, WOOD P M. Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components[J]. Biochim Et Biophys Acta BBA-Bioenerg, 2001, 1504: 179-195.

[69] JOSEPH-HORNE T, WOOD P M, HEPPNER C, et al. Involvement of the alternative oxidase in cellular energy production in the wheat 'take all' fungus, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritic*[J]. Pestic Sci, 1999, 55(3): 367-370.

[70] ZIOGAS B N, BALDWIN B C, YOUNG J E. Alternative respiration: a biochemical mechanism of resistance to azoxystrobin (ICIA 5504) in *Septoria tritici*[J]. Pestic Sci, 1997, 50(1): 28-34.

[71] SORBO G D, SCHOONBEEK H J, WAARD M A D. Fungal transporters involved in efflux of natural toxic compounds and fungicides[J]. Fungal Genet Biol, 2000, 30(1): 1-15.

[72] WAARD M A D, ANDRADE A C, HAYASHI K, et al. Impact of fungal drug transporters on fungicide sensitivity, multidrug resistance and virulence[J]. Pest Manag Sci, 2006, 62(3): 195-207.

[73] STERGIOPOULOS I, ZWIERS L, MAARTEN A D W. Secretion of natural and synthetic toxic compounds from filamentous fungi by membrane transporters of the ATP-binding cassette and major facilitator superfamily[J]. Eur J Plant Pathol, 2002, 108: 719-734.

[74] ANDRADE A C, SORBOD S, JOHANNES G M, et al. The ABC transporter *AtrB* from *Aspergillus nidulans* mediates resistance to all major classes of fungicides and some natural toxic compounds[J]. Microbiology, 2000, 146: 1987-1997.

[75] SOMAI-JEMMALI L, SELIM S, SIAH A, et al. Fungicide sensitivity of *Mycosphaerella graminicola* Tunisian isolates: the importance of drug transporter genes in the process of fungicide tolerance[J]. Phytopathol Mediterr, 2014, 53(1): 83-93.

[76] ZIOGAS B N, MARKOGLOU A N, THEODOSIOU D I, et al. A high multi-drug resistance to chemically unrelated oomycete fungicides in *Phytophthora infestans*[J]. Eur J Plant Pathol, 2006, 115(3): 283-292.

[77] FONTAINE S, REMUSON F, FRAISSINET-TACHET L, et al. Monitoring of *Venturia inaequalis* harbouring the QoI resistance G143A mutation in French orchards as revealed by PCR assays[J]. Pest Manag Sci, 2009, 65(1): 74-81.

[78] DUAN Y B, ZHANG X K, GE C, et al. Development and application of loop-mediated isothermal amplification for detection of the F167Y mutation of carbendazim-resistant isolates in *Fusarium graminearum*[J]. Sci Rep, 2014, 4: 7094.

[79] FAN F, YIN W X, LI G Q, et al. Development of a LAMP method for detecting SDHI fungicide resistance in *Botrytis cinerea*[J]. Plant Dis, 2018, 102(8): 1612-1618.

(责任编辑: 金淑惠)