

番茄灰霉病菌对啞霉胺的抗药性

纪明山 祁之秋 王英姿 程根武 谷祖敏

(沈阳农业大学植物保护学院农药科学系, 沈阳 110161)

摘要: 2001年从辽宁省不同地区的保护地中采集番茄灰霉病果或病叶,经单孢分离共获得番茄灰霉病菌70株。采用菌丝生长速率法测定了其对啞霉胺的敏感性。结果表明,番茄灰霉病菌已对啞霉胺产生中等水平抗药性,抗性频率为20.0%。经室内药剂诱导获得了高抗菌株,抗性倍数最高达35.7倍。啞霉胺与多菌灵及啞霉胺与速克灵间不存在交互抗药性。野生抗性菌株具有较好的遗传稳定性,连续转接9次后抗药性无明显下降。不同菌株的菌丝生长速度、鲜重和渗透敏感性存在显著差异,但该差异与灰霉病菌对啞霉胺的敏感性无相关性。抗性菌株与敏感菌株具有同样的致病能力。

关键词: 番茄; 灰葡萄孢菌; 啞霉胺; 抗药性

番茄灰霉病是由灰葡萄孢菌 *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. 引起的一种病害,危害番茄的茎、叶、花、果实等,造成严重减产甚至绝收。随着保护地面积不断扩大,灰霉病的危害也日趋严重,已成为保护地番茄上的重要病害。啞霉胺(pyrimethanil)是啞啞胺类杀菌剂,对灰霉病特效,兼有保护和治疗作用。它不抑制孢子的萌发,但能抑制芽管的伸长和菌丝的生长。啞霉胺直接作用位点尚未研究清楚,但已有研究表明,它能够抑制蛋氨酸合成和胞壁水解酶分泌^[1]。20世纪90年代初,啞霉胺率先在欧洲大面积推广,用以防治葡萄、草莓等作物的灰霉病。1998年,啞霉胺在我国首次获得农药登记,同年开始在辽宁省保护地番茄推广使用。本试验旨在测定辽宁省番茄灰霉病菌对啞霉胺的抗药性水平,并研究抗药性菌株的生物学特性。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

菌株:2001年4~5月,在辽宁省鞍山、锦州、沈阳和瓦房店4个地区,从具有啞霉胺不同使用历史的保护地中,采集番茄灰霉病果或病叶,于PDA培养基上单孢分离灰葡萄孢菌。共获得代表性菌株70株。杀菌剂:95.5%啞霉胺原药,由昆山瑞泽农药股份有限公司提供;90.5%多菌灵(carbendazim)原药,沈阳农药厂生产;50%速克灵(procymidone)可湿性粉剂,日本住友化学工业株式会社生产。

作者简介:纪明山(1966-),男,博士,从事农药教学与研究(E-mail: jimingshan@yahoo.com.cn)

收稿日期:2002-11-21

1.2 番茄灰霉病菌对啞霉胺敏感性的测定

采用菌丝生长速率法测定各菌株的 EC_{50} 值。培养基按 Chapeland 等的方法^[2] 配制:葡萄糖 10g、琼脂 12.5g、 KH_2PO_4 2g、 K_2HPO_4 1.5g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 5g、 $(NH_4)_2SO_4$ 1g,加蒸馏水至 1000ml。依据预备试验结果,当某菌株的 EC_{50} 值小于 $0.45 \mu g/ml$ 时,为敏感菌株(S);当 EC_{50} 值大于等于 $0.45 \mu g/ml$,小于 $0.90 \mu g/ml$ 时,为中抗菌株(MR);当 EC_{50} 值大于等于 $0.90 \mu g/ml$ 时,为高抗菌株(HR)。

1.3 啞霉胺室内诱导抗药性

将菌株 JZ20、JZ35、JZ36、SY40 和 SY41 分别接种到含亚致死剂量的啞霉胺平板上,25℃ 培养 2 天,挑取菌丝接种到另一平板上,逐渐提高药剂浓度,连续转接 20 次后,测定其对啞霉胺的敏感性。

1.4 啞霉胺与多菌灵和速克灵的交互抗药性测定

采用菌丝生长速率法,测定多菌灵和速克灵对 AS5、JZ22、JZ36、WD27、SY41 和 SY41-HR 共 6 株灰霉病菌的 EC_{50} 值。分别将啞霉胺与多菌灵及啞霉胺与速克灵 EC_{50} 值作直线相关分析。

1.5 抗性菌株遗传稳定性测定

将野生中抗菌株 JZ36 和室内诱导获得的高抗菌株 SY41-HR 接种到无药平板上,连续转接 9 次,分别测定第 3、6、9 次转接菌对啞霉胺的敏感性。

1.6 不同敏感性菌株生物学特性测定

菌丝生长速度:将 1.4 中 6 株灰霉病菌的菌碟分别置于无药平板上,21℃ 培养 3 天后,测量菌落直径。菌丝鲜重:将 6 株灰霉病菌菌碟放入装有 50ml 的液体培养基的三角瓶中,21℃ 130 r/min 振荡培养 5 天,菌丝过滤清洗后,测量鲜重。菌丝渗透敏感性:将 6 株灰霉病菌菌碟移入含 0.68 mol/L NaCl 的平板上,21℃ 培养 3 天,测量菌落直径。

1.7 不同敏感性菌株致病性测定

分别将 JZ36、WD27、SY41 和 SY41-HR 的菌碟接种到叶龄一致的番茄叶片正面,21℃ 保湿培养 3 天后,测病斑直径。

2 结果与分析

2.1 番茄灰霉病菌对啞霉胺的敏感性

经单孢分离,共获得代表啞霉胺不同使用历史的番茄灰霉病菌 70 株,采用菌丝生长速率法测定啞霉胺对各菌株的 EC_{50} 值。结果表明,其中 14 株属中抗菌株,占测定菌株的 20.0%;以 JZ36 的 EC_{50} 值最高,达 $0.8779 \mu g/ml$;其余菌株的 EC_{50} 值均小于 $0.45 \mu g/ml$,为敏感菌株,以 JZ22 最为敏感, EC_{50} 值为 $0.0890 \mu g/ml$;试验中未检测到高抗菌株。

2.2 番茄灰霉病菌对啞霉胺室内诱导抗药性

将具有不同敏感性的番茄灰霉病菌菌株,在含有不同浓度啞霉胺的平板上连续转接 20 次后,供试菌株全部被诱导为高抗菌株(表 1), EC_{50} 值最高达 $5.6747 \mu g/ml$,是其原野生菌株的 35.7 倍。

表1 番茄灰霉病菌对啞霉胺的室内诱导抗药性

Table 1 Resistance of *Botrytis cinerea* to pyrimethanil induced in laboratory

菌株 Isolate	诱导前 Before induction		诱导后 After induction	
	EC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	敏感性 Sensitivity	EC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	敏感性 Sensitivity
JZ20	0.4354	S	5.1088	HR
JZ35	0.1591	S	5.6747	HR
JZ36	0.8779	MR	5.2350	HR
SY40	0.2444	S	1.1025	HR
SY41	0.3745	S	3.2149	HR

2.3 啞霉胺与多菌灵和速克灵的交互抗药性

交互抗药性研究结果见图1,啞霉胺与多菌灵及啞霉胺与速克灵间 EC₅₀ 值的相关系数分别为 0.0811 和 0.5755,在 $P=0.05$ 水平上均不显著,说明啞霉胺与多菌灵及啞霉胺与速克灵间不存在交互抗药性。

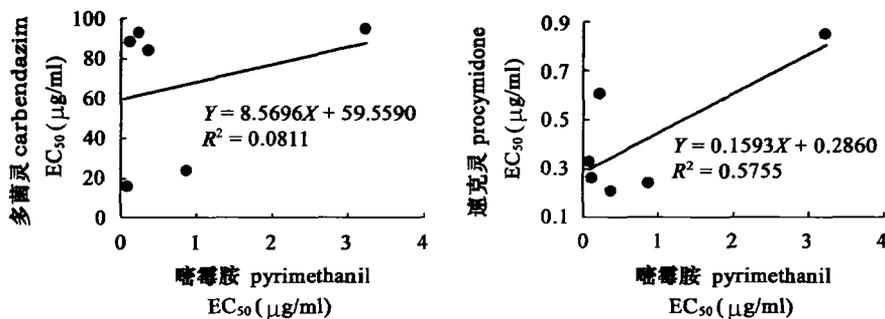


图1 灰霉病菌对啞霉胺与多菌灵和速克灵的交互抗药性

Fig. 1 Cross-resistance between pyrimethanil and carbendazim and that between pyrimethanil and procymidone

2.4 抗性菌株遗传稳定性

室内诱导高抗菌株 SY41-HR 及野生中抗菌株 JZ36 在无药平板上连续转接,其 EC₅₀ 值逐渐下降(表2)。转接9次后,SY41-HR 的 EC₅₀ 值降低了3.6倍。而 JZ36 的 EC₅₀ 值下降缓慢,始终保持着对啞霉胺的中等抗药性,表明野生抗性菌株有较好的遗传稳定性。

2.5 不同敏感性菌株的生物学特性

从表3可以看出,对啞霉胺敏感性不同的番茄灰霉病菌菌株的生长速度、菌丝鲜重、渗透敏感性有所差异,有的菌株间甚至达到显著水平。将其分别与相应菌株的 EC₅₀ 值作直线相关分析,相关系数分别为 0.6284、0.1273 和 0.1881,在 $P=0.05$ 水平上均不显著,说明这些生物学特性差异与敏感性无相关性,即抗性菌株与敏感菌株具有相同的适应性。

2.6 不同敏感性菌株的致病性

试验发现,对啞霉胺具有不同敏感性的番茄灰霉病菌菌株 JZ36、WD27、SY41 和 SY41

表 2 抗性菌株连续转接培养后 EC₅₀ 值的变化Table 2 The changes of EC₅₀ of resistant *Botrytis cinerea* isolates after continuously transference

转接次数 Transfer times	SY41-HR		JZ36	
	EC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	敏感性 Sensitivity	EC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	敏感性 Sensitivity
0	3.2149	HR	0.8779	MR
3	1.7370	HR	0.7993	MR
6	1.1175	HR	0.6822	MR
9	0.6921	MR	0.5870	MR

表 3 不同敏感性菌株生物学特性比较

Table 3 Comparisons of biological characteristics among different sensitivity isolates

菌株 Isolate	EC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	菌落直径(mm) Colony diameter	菌丝鲜重(g) Mycelium fresh weight	渗透敏感性(mm) Osmotic sensitivity
SY41-HR	3.2149	68.2 a	11.45 a	51.0 a
JZ36	0.8779	64.8 b	3.42 b	46.7 b
SY41	0.3745	60.2 b	12.53 a	42.0 c
JZ22	0.0890	32.0 d	5.17 b	46.3 bc
WD27	0.1230	52.5 c	7.87 a	37.0 d
ASS	0.2341	54.0 c	7.28 a	27.0 e

注:相同字母表示在 $P=0.05$ 水平上差异不显著。Note: The same letters in the same rows indicate no significant difference ($P=0.05$).

-HR,对番茄叶片的致病性无显著差异($P=0.05$),表明无论是室内诱导的还是野生的抗药性菌株,均与敏感菌株具有同样的致病性。

3 讨论

自 20 世纪 70 年代以来,相继采用了苯并咪唑类、二甲酰亚胺类、N-苯基氨基甲酸酯类、苯基吡咯类、三唑类等多种杀菌剂防治灰霉病,但病原菌在短时间内陆续对这些杀菌剂均产生了抗药性,田间防治效果下降或完全丧失。为了获得理想的防治效果,农民不得不加大用药剂量、增加使用次数,这进一步加重了对抗药性菌株的选择压力,使高抗菌株逐渐成为优势菌株,甚至出现了多重抗药性菌株^[3,4]。啞霉胺作用位点单一,属高抗药性风险杀菌剂^[5]。近年已有多篇关于灰葡萄孢菌对啞霉胺产生抗药性的报道^[2,5],并出现了高抗药性菌株,甚至失去田间防治效果^[6]。本研究表明,辽宁省保护地番茄灰霉病菌已对啞霉胺产生中等水平抗药性,并与多菌灵及速克灵无交互抗药性。Lorenz 等(1985)和 Lattore 等(1994)曾报道^[7,8],灰霉病菌的生长速度及渗透敏感性不同菌株间存在显著差异,但该差异与灰霉病菌对二甲酰亚胺类杀菌剂敏感性无关。Lattore 等(2002)试验表明,其与灰霉病菌对啞啞胺类杀菌剂啞啞环胺的敏感性无关^[5]。本研究表明,这些差异与灰霉病菌对啞霉胺的敏感性亦无关。致病性研究进一步证明,抗性菌株与敏感菌株具有同样的致病能力。啞霉胺在本省推广年限较短,目前仍是防治番茄灰霉病的有效药剂。

但许多农民习惯于连年使用同一杀菌剂,且一季喷洒多次,这为病原菌产生抗药性创造了极为有利的条件,多菌灵、速克灵等杀菌剂已是前车之鉴。为延长嘧霉胺的使用寿命,避免因产生严重抗药性给生产造成重大损失,建议积极采取推广综合防治技术、减少每季用药次数和将不同作用机制杀菌剂复配或交替使用等措施。

参 考 文 献

- 1 Leroux P. Recent developments in the mode of action of fungicides. *Pestic. Sci.*, 1996, 47:191-197
- 2 Chapeland F, Fritz R, Lanen C, *et al.* Inheritance and mechanisms of resistance to anilinopyrimidine fungicides in *Botrytis cinerea* (*Botryotinia fuckeliana*). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 1999, 64: 85-100
- 3 刘波,叶钟音. 对多菌灵、速克灵具多重抗性的灰葡萄孢菌株性质的研究. *南京农业大学学报*, 1993, 16(3): 50-54
- 4 纪明山,程根武,张益先,等. 灰霉病菌对多菌灵和乙霉威抗性研究. *沈阳农业大学学报*, 1998, 29(3): 213-216
- 5 Latorre B A, Spadaro I, Rioja M E. Occurrence of resistance of *Botrytis cinerea* to anilinopyrimidine fungicides in table grapes in Chile. *Crop Protect.*, 2002, 21(12): 957-961
- 6 Forster B, Staub T. Basis for use strategies of anilinopyrimidine and phenylpyrrole fungicides against *Botrytis cinerea*. *Crop Protect.*, 1996, 15(6): 529-537
- 7 Lorenz G, Pommer E H. Morphological and physiological characteristics of dicarboximide-sensitive and resistant isolates of *Botrytis cinerea*. *EPPO*, 1985, 15: 353-360
- 8 Latorre B A, Flores V, Sara A, *et al.* Dicarboximide-resistant isolates of *Botrytis cinerea* from table grapes in Chile: survey and characterization. *Plant Dis.*, 1994, 78: 990-994

Resistance of *Botrytis cinerea* to pyrimethanil in tomato

Ji Mingshan Qi Zhiqiu Wang Yingzi Cheng Genwu Gu Zumin

(Department of Pesticide Science, College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: Seventy *Botrytis cinerea* single-spore isolates were obtained from diseased tomato fruits or leaves collected in 2001 from protected fields in several regions of Liaoning Province. Sensitivity of these isolates to anilinopyrimidine fungicide pyrimethanil was determined by the methods of mycelial growth inhibition. The results showed that 20.0% isolates were moderately resistant. High resistant isolates were induced by the fungicide in laboratory but not detected in field. The highest resistant strength reached to 35.7 fold. There was no cross-resistance between pyrimethanil and carbendazim as well as that between pyrimethanil and procymidone. The wild-type resistant isolates showed a good inherit stability. No decreasing of resistant level appeared after 9 times of transference. Significant differences in mycelial growth, fresh weight and osmotic sensitivity were observed among isolates of *B. cinerea*, but no correlation could be drawn between these biological differences and sensitivity. It was also found that there were no differences between resistant isolates and sensitive ones in pathogenetic ability.

Key words: tomato; *Botrytis cinerea*; pyrimethanil; resistance to fungicide