

辽宁省蔬菜灰霉病菌对啞霉胺的抗药性

赵 琳, 纪明山*, 祁之秋, 程根武

(沈阳农业大学植物保护学院农药科学系, 沈阳 110161)

摘要 2006 年从辽宁省不同地区采集蔬菜灰霉病果或病叶, 经分离共获得灰霉病菌株 86 株。采用菌丝生长速率法测定了其对啞霉胺的敏感性。试验结果表明, 灰霉病菌对啞霉胺产生中等水平抗药性, 抗性频率为 17.41%。经紫外、药剂联合诱导获得了高抗菌株, 抗性倍数最高达 62.78 倍。啞霉胺与多菌灵和腐霉利间不存在交互抗药性, 苯胺基啞唑类杀菌剂之间存在交互抗性。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、鲜重和产孢量存在明显差异, 但该差异与灰霉病菌对啞霉胺的敏感性无相关性。

关键词 灰葡萄孢菌; 啞霉胺, 抗药性

中图分类号

Study on resistance of *Botrytis cinerea* to pyrimethanil in vegetable of Liaoning Province

Zhao Lin, Ji Mingshan, Qi Zhiqiu, Cheng Genwu

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

Abstract Eighty-six *Botrytis cinerea* strains were isolated from diseased vegetable fruits or leaves collected in 2006 from different regions of Liaoning Province. Sensitivity of these isolates to pyrimethanil was determined by the methods of mycelial growth inhibition. The results showed that 17.41% isolates were moderately resistant. High resistant isolates were induced by ultraviolet light and fungicide in laboratory but not detected in field. The highest resistant strength reached to 62.78 fold. There was no cross-resistance between pyrimethanil and carbendazim as well as that between pyrimethanil and procymidone. There was cross-resistance between anilino-pyrimidine fungicides. 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 sporulation quantity were observed among isolates of *B. cinerea*, but no correlation could be drawn between these biological differences and sensitivity.

Key words *Botrytis cinerea*; pyrimethanil, resistance to fungicide

由灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea* Pers. ex Fr.) 引起的番茄灰霉病是保护地蔬菜生产上危害最严重

的病害之一。自20世纪70年代以来,生产上相继用多菌灵、腐霉利、乙烯菌核利等杀菌剂防治该病害,但病原菌在短时间内陆续对这些杀菌剂产生了抗药性,甚至出现了多重抗药性菌株^[1-2],田间防效明显下降。嘧霉胺(pyrimethanil)是嘧啶胺类杀菌剂,对灰霉病特效,兼有保护和治疗作用。20世纪90年代初,嘧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年嘧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蔬菜灰霉病菌对嘧霉胺的抗药性水平,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

供试菌株:2006年3~5月,自辽宁省沈阳、鞍山、大连、辽阳、朝阳、抚顺、本溪、铁岭8个城市的温室中,采集已经使用过嘧霉胺却发生灰霉病的病果或病叶。在PDA培养基上分离灰葡萄孢菌,共获得代表性菌株86株。杀菌剂:95.5%嘧霉胺原药(昆山瑞泽农药股份有限公司);90.5%多菌灵(carbendazim)原药(沈阳农药厂生产);50%腐霉利(procymidone)可湿性粉剂(速克灵,日本住友化学工业株式会社生产);50%嘧菌环胺水分散剂(先正达公司生产)。

1.2 灰霉病菌对嘧霉胺敏感性的测定

采用菌丝生长速率法测定各菌株的 EC_{50} 值。培养基采用L-asg· K_2HPO_4 、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 各1g, KCl 0.5g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01g, L-天冬酰胺2g, 葡萄糖22g, 琼脂20g, 加蒸馏水至1L。灰葡萄孢对嘧霉胺的敏感性划分标准:当某菌株的 $EC_{50} < 0.45 \mu g/mL$ 时,为敏感菌株(S);当 $0.45 \leq EC_{50} < 0.90 \mu g/mL$ 时,为中抗菌株(MR);当 $EC_{50} \geq 0.90 \mu g/mL$ 时,为高抗菌株(HR)。

1.3 紫外、药剂联合诱导抗药性

在含有嘧霉胺不同浓度(0.5、1、2 $\mu g/mL$)及对照的L-asg培养基平板上,涂抹0.1 mL供试菌株 C_2 、 H_9 、 F_{35} 的分生孢子悬浮液($10^3 \sim 10^4$ 个/mL),涂匀后25℃培养2h。然后置于稳定紫外灯(25W)400mm下照射,照射时间分别为30、60、90、120s。然后放入恒温培养箱25℃培养3d,数每个平板长出的菌落数,挑取长出的菌落边缘置于含1 $\mu g/mL$ 嘧霉胺L-asg平板上,能够生长的菌落即为抗药性突变体。

1.4 嘧霉胺与嘧菌环胺、多菌灵和腐霉利的交互抗药性测定

采用菌丝生长速率法,测定多菌灵和腐霉利对 HH_9 、 H_5 、 F_{22} 、 F_{79} 、 C_{11} 、 H_{11} 共6株灰霉病菌的 EC_{50} 。分别将嘧霉胺与嘧菌环胺、多菌灵及腐霉利的 EC_{50} 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 H_4 和室内诱导获得的高抗菌株 HH_9 接种到无药平板上,连续转接9次,分别测定第3、6、9次转接菌对嘧霉胺的敏感性。

1.6 不同敏感性菌株生物学特性测定

菌丝生长速度:将 HH_9 、 H_4 、 H_9 、 H_2 、 F_{22} 、 C_{10} 6株灰霉病菌的菌碟分别置于无药平板上,25℃培养3d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液体培养基的三角瓶中,22℃、130r/min振荡培养5d,菌丝过滤清洗后,测量鲜重。产孢量:将6株灰霉病菌菌碟移入PSA平板上,22℃培养15d,每皿中加入10mL无菌水,冲洗孢子,过滤,得孢子悬浮液,用血球计数板记录孢子数。

2 结果与分析

2.1 灰霉病菌对嘧霉胺的敏感性

经分离共获得代表嘧霉胺不同使用历史的灰霉病菌86株,采用菌丝生长速率法测定嘧霉胺对各菌株的 EC_{50} 。结果表明,其中9株属中抗菌株,占测定菌株的10.47%,6株属高抗菌株,占测定的6.98%。以 F_{66} 最敏感, EC_{50} 为0.0372 $\mu g/mL$, C_{13} 抗性最大, EC_{50} 达到3.1610 $\mu g/mL$ 。

2.2 灰霉病菌对嘧霉胺诱导抗药性

采用紫外、药剂联合诱导,供试菌株全部被诱导为高抗菌株(表1), EC_{50} 最高达5.7195 $\mu g/mL$,是敏感基线0.0911的62.78倍。

表1 灰霉病菌对嘧霉胺的诱导抗药性

菌株	诱导前		诱导后	
	$EC_{50}/\mu g \cdot mL^{-1}$	敏感性	$EC_{50}/\mu g \cdot mL^{-1}$	敏感性
C_2	0.1680	S	5.1391	HR
H_9	0.1271	S	5.7195	HR
F_{35}	0.1789	S	5.2658	HR

2.3 嘧霉胺与嘧菌环胺、多菌灵和腐霉利的交互抗药性

交互抗性研究结果见图1。嘧霉胺与多菌灵及嘧霉胺与腐霉利间 EC_{50} 的相关系数分别为0.1236和0.0022,在 $p=0.05$ 水平上均不显著,说明嘧霉

胺与多菌灵及嘧霉胺与腐霉利间不存在交互抗药性。嘧霉胺与嘧菌环胺间 EC_{50} 的相关系数为

0.968 4, 在 $p=0.05$ 水平上差异显著, 说明嘧霉胺与嘧菌环胺间存在正交互抗性。

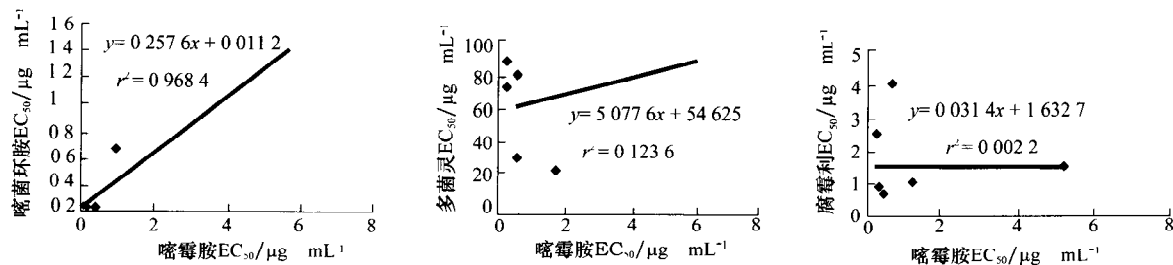


图1 灰霉病菌与嘧菌环胺、多菌灵和腐霉利的交互抗药性

2.4 抗性菌株遗传稳定性

室内诱导高抗菌株 HH₉ 及野生中抗菌株 H₄ 在无药平板上连续转接, 其 EC_{50} 值逐渐下降(见表2)。转接9次后, HH₉ 的 EC_{50} 值降低了67.9倍。而 H₄ 的 EC_{50} 值下降缓慢, 始终保持着对嘧霉胺的中等抗药性, 表明野生抗性菌株有较好的遗传稳定性。

表2 灰霉病菌抗性菌株连续转接培养后 EC_{50} 的变化

转接次数	HH ₉		H ₄	
	$EC_{50}/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	敏感性	$EC_{50}/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	敏感性
0	5 719 5	HR	0 829 7	MR
3	3 091 6	HR	0 755 4	MR
6	1 994 6	HR	0 644 7	MR
9	0 874 2	MR	0 554 8	MR

2.5 不同敏感性菌株的生物学特性

从表3可以看出, 对嘧霉胺敏感性不同的灰霉病菌菌株的生长速度、菌丝鲜重、产孢量有所差异, 有的菌株间甚至达到显著水平。将其分别与相应菌株的 EC_{50} 作直线相关分析, 相关系数分别为0.412 6、0.508 7和0.796 2, 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。

表3 灰霉病菌不同敏感性菌株生物学特性比较¹⁾

菌株	EC_{50} $/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	菌落直径 $/\text{mm}$	菌丝鲜重 $/\text{g}$	产孢量 $/\times 10^6 \text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$
HH ₉	5 719 5	28.80 c	10.63 a	40.41 a
II ₄	0 829 7	58.32 a	3.39 c	1.09 d
H ₉	0 127 1	43.72 b	11.60 a	15.93 b
H ₂	0 050 0	61.38 a	4.98 bc	5.25 c
F ₂₂	0 152 5	47.25 b	7.41 b	6.34 c
C ₁₀	0 214 2	48.60 b	6.22 bc	12.38 b

1) 相同字母表示在 $p=0.05$ 水平上差异不显著。

3 结论与讨论

试验结果表明, 辽宁省灰霉病菌已对嘧啉胺类

杀菌剂嘧霉胺产生抗药性, 但仍处于中等抗性水平, 平均抗药性频率达17.41%; 不同地区抗药性频率存在差异, 嘧霉胺使用较多的沈阳市、辽阳市、大连市和鞍山市抗药性频率较高。在离体条件下, 抗药性菌株具有良好的遗传稳定性及与敏感菌株相似的适应性, 这意味着抗药性菌株在田间具有较高的适合度, 如果嘧霉胺长期、连续使用将导致抗药性菌株比例上升, 防治失败。

苯并咪唑类杀菌剂多菌灵与二甲酰亚胺类杀菌剂腐霉利作为防治灰霉病的主要药剂在许多蔬菜产地已产生抗药性。交互抗性测定结果表明, 此二类杀菌剂与嘧霉胺不存在交互抗性, 可以用来治理对多菌灵和腐霉利产生抗性的灰霉病菌。嘧啉胺类杀菌剂嘧菌环胺目前尚未在辽宁省大面积推广使用, 从其与同类杀菌剂嘧霉胺之间存在正交互抗性结果看出, 灰霉病菌也可能对嘧菌环胺产生抗药性。因此, 为延缓其抗性产生, 建议与不同作用机制的杀菌剂轮换使用, 制定合理的用药次数与频率。

嘧霉胺作用位点单一, 属高抗药性风险杀菌剂^[3]。近年已有多篇关于灰葡萄孢菌对嘧霉胺产生抗药性的报道^[4-6], 甚至出现了高抗药性菌株。嘧霉胺在辽宁省目前仍是防治灰霉病的有效药剂。但许多农民习惯于连年使用同种杀菌剂, 且一季喷洒多次, 这给病原菌产生抗药性创造了极为有利的条件, 为延长嘧霉胺的使用寿命, 避免因产生严重抗性给生产造成重大损失, 建议根据不同地区的抗药性水平积极采取相应措施, 如推广综合防治技术、减少每季用药次数、与不同作用机制的杀菌剂复配或交替使用等。

参考文献

- [1] 刘波, 叶钟音, 刘经芬, 等 对多菌灵、速克灵具多重抗性的灰葡萄孢菌株性质的研究[J] 南京农业大学学报, 1994, 16(3): 50-54
- [2] 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[J] 沈阳农业大学学报,1998,29(3) 213-216
- [3] Latorre B A, Spadaro I, Rija M E Occurrence of resistant of *Botrytis cinerea* to anilinopyrimidine fungicides in table grapes in Chile[J] Crop Protec,2002,21(12) 957-961
- [4] Hilber U W, Schukepp H A reliable method for testing the sensitivity of *Botryotinia fuckeliana* to anilinopyrimidines in vitro[J] Pestic Sci,1996,47 241-247
- [5] Hilber U W, Schukepp H Mycelial growth test for assessment of anilinopyrimidine sensitivity of grey mould (*Botryotinia fuckeliana*)[J] EPPO Bull,1996,26 184-186
- [6] Rueegg J, Lauber H P, Siegfried W, et al Experiences with anilinopyrimidines in Switzerland and Pestif[J] Outlook,1997,8(3) 28-33
- [7] Forster B, Staub T Basis for use strategies of anilinopyrimidine and phenylpyrrole fungicides against *Botrytis cinerea*[J] Crop Protec,1996,15(6) 529-537