

禾谷丝核菌对戊唑醇的抗性及其 抗药性菌系生物学特性

刘英华 王开运* 姜兴印 仪美芹 王怀训

(山东农业大学植物保护学院农药系, 泰安 271018)

摘要: 在含戊唑醇 PDA 平板培养基上, 对禾谷丝核菌进行逐代处理, 以诱导其抗药性菌系; 比较抗性和敏感菌系的生物学特性, 测定抗性菌系对其它杀菌剂的交互抗性。结果表明, 选育至 35 代, 对戊唑醇抗性达 33.4 倍。抗戊唑醇菌系与敏感亲本菌系相比, 其菌丝生长速率、菌丝干重、菌核产生速率、菌核数及干重均存在差异。抗性菌系较敏感菌系对冬小麦幼苗的致病力减弱, 但小麦返青后抗性菌系引起的发病率和严重度均较敏感菌系增强。戊唑醇抗性菌系对三唑酮、丙环唑、井冈霉素、福美双、噁醚唑和咯菌腈 6 种药剂分别产生了 31.2、22.8、16.9、15.8、15.5 和 1.6 倍的交互抗性。

关键词: 禾谷丝核菌; 戊唑醇; 抗药性; 生物学特性; 交互抗性

小麦纹枯病是一种分布广泛的世界性小麦病害, 早在 1934 年国外就有报道。1973 年以来, 此病在我国发生并逐年加重。近年来在鲁、豫、陕、苏、皖等老麦区发生较为普遍, 已成为影响小麦高产稳产的重大障碍。

目前小麦品种对该病的抗性普遍较差, 控制此病主要依靠化学防治, 用三唑类内吸性杀菌剂在播种时进行种子处理是防治此病的有效措施^[1~3]。德国拜耳公司 20 世纪 80 年代开发了三唑类杀菌剂戊唑醇, 并推出 2% 立克秀干拌种剂和 2% 干种衣剂用于种子处理, 对于防治该病具有很好的效果, 同时也能兼治麦类黑穗、散黑粉病^[4~7]。但据作者对江苏镇江、山东泰安、滕州、聊城等麦区小麦纹枯病菌菌株的抗药性研究表明, 已发现抗性菌株。笔者通过小麦纹枯病菌戊唑醇菌系的诱导和抗性菌系的生物学特性、致病力以及交互抗药性的研究, 为评价该菌抗戊唑醇的风险性和戊唑醇的科学使用提供了依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试亲本敏感菌株: 采自泰山中天门狗尾草上, 经分离鉴定确定为禾谷丝核菌

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目(2002BA516A12)

作者简介: 刘英华(1976-), 女, 助研, 现在天津市卫生防病中心从事病原鉴定和防疫研究

* 通讯作者(E-mail: kywang@sdau.edu.cn); 收稿日期: 2002-08-10

Rhizoctonia cerealis, 从未使用过化学药剂, 敏感度较高。

1.1.2 药剂:戊唑醇(tebuconazole)97%原药, 山东华阳科技股份有限公司;三唑酮(tridimefon)95%原药, 山东大成农药工业股份公司;丙环唑(propiconazole)25%敌力脱乳油, 瑞士诺华有限公司;噁醚唑(difenoconazole)3%敌萎丹悬浮种衣剂, 安万特公司;咯菌腈(fludioxonil)2.5%适乐时悬浮种衣剂, 安万特公司;井冈霉素(jinggangmycin)15%水溶性粉剂, 山东威海农药厂;福美双(thiram)96.5%原药, 青岛第二农药厂。

1.2 小麦纹枯病菌抗药性菌系的诱导

将供试敏感菌株稳定培养后, 分成敏感菌系和戊唑醇菌系, 并测定戊唑醇的毒力基线。戊唑醇菌系的建立, 每代以药剂抑制菌丝生长 50% 以上的浓度, 在含药的 PDA 培养基上诱导选择培养, 每选择 3 代用 FAO 推荐的菌落直径法测定 1 次 EC_{50} , 观察诱导菌系对药剂的抗性变化。

1.3 生物学特性测定

1.3.1 抗性菌系的致病性测定:将干麦麸与玉米面按 3:1(g:g)混匀, 加水调和, 使固体培养基的含水量为 50%(g), 装入三角瓶灭菌。将供试菌株在 25℃ 的 PDA 平板上培养 3 天, 制成直径 5mm 的菌碟后, 接入三角瓶内的固体培养基上, 每瓶接 5 片, 置于 25℃ 培养箱中培养至菌丝长满培养基;然后将固体培养基取出, 捻碎, 风干, 均匀撒施于播种沟内, 然后播种感病品种鲁麦 331, 接种物强度(g/m)为 20, 重复 3 次。处理后分别于 12 月下旬、次年 3 月中旬、4 月中旬和 5 月中旬, 采用五点取样法调查小麦纹枯病的发病情况, 计算病情指数。幼苗期分级标准:0 级:无症状;1 级:叶鞘变褐;2 级:叶鞘外具有明显的纹枯病斑;3 级:具有侵入叶鞘的病斑;4 级:具有侵入茎秆的病斑或者植株枯死。成株期分级标准:0 级:无病;1 级:第 1、2 叶鞘发病, 茎秆无病斑;2 级:第 3、4 叶鞘发病, 茎秆无病斑;3 级:第 1、2 叶鞘发病, 病斑绕茎秆小于 1/2;4 级:第 3、4 叶鞘发病, 病斑绕茎秆大于 1/2;5 级:第 5、6 叶鞘发病或病斑绕茎秆一周;6 级:整株枯死或出现枯孕穗、枯白穗。

1.3.2 抗性菌系的生长量测定:将抗戊唑醇菌系及敏感菌系制成 5mm 菌碟, 在 PDA 平板上 25℃ 培养, 测定 1、2、3 天的菌落直径。敏感和抗性菌系以每菌株 5 个菌碟接入 100ml PDA 培养基中, 25℃ 条件下震荡培养 5 天后, 将菌丝通过布氏漏斗过滤, 然后将其与预先在红外线快速干燥器中烘干称重的滤纸一起烘干、称重, 然后减去滤纸重即为菌丝干重, 重复 3 次。

1.3.3 抗性菌系产菌核测定:将抗戊唑醇菌系及敏感菌系制成 5mm 菌碟, 在 PDA 平板上 25℃ 培养, 测定菌核出现时间、形成时间、每皿菌核数量及菌核重。

1.4 交互抗药性测定

分别制成含系列浓度的三唑酮、井冈霉素、咯菌腈、福美双、噁醚唑、丙环唑的 PDA 培养基平板, 利用菌落直径法测定对戊唑醇抗性菌系的 EC_{50} 。

1.5 抗性菌系对渗透压的敏感性测定

将抗性菌系和敏感菌系的菌碟分别接入 1%、2%、4%、8% 葡萄糖 PDA 培养基, 25℃ 培养 3 天后测量菌落直径, 以 2% 葡萄糖 PDA 平板上生长的菌落直径为对照, 计算不同葡萄糖浓度培养基上的菌丝线性生长抑制率。

2 结果与分析

2.1 小麦纹枯病菌对戊唑醇的抗性变化

将敏感菌株在含药培养基上培养至第 6 代,其对戊唑醇的 EC₅₀ 由 0.0120 μg/ml 增加到 0.0337 μg/ml,抗性达 2.8 倍;至第 12 代,EC₅₀ 为 0.0602 μg/ml,抗性达 5.0 倍;至第 18 代,EC₅₀ 为 0.0947 μg/ml,抗性达 7.9 倍;至第 24 代,EC₅₀ 为 0.1332 μg/ml,抗性达 11.1 倍;至第 29 代,EC₅₀ 为 0.1889 μg/ml,抗性达 15.7 倍;至第 35 代,EC₅₀ 为 0.4004 μg/ml,抗性达 33.4 倍,形成了较高水平的抗性菌系。在抗性选育中,F3 ~ F9 和 F29 ~ F35 为两个抗性突增阶段(表 1)。

表 1 禾谷丝核菌对戊唑醇的抗性发展规律
Table 1 Resistance development of *Rhizoctonia cerealis* to tebuconazole

选育代数 Generation	毒力回归式 (Y = a + bX) Regression equation	r	EC ₅₀ (μg/ml)	抗性倍数 (R/S) Resistance factor
F ₀	6.9415 + 0.9634X	0.9372	0.0120	1.0
F ₃	7.3115 + 1.7033X	0.9975	0.0140	1.2
F ₆	6.0793 + 1.0494X	0.9828	0.0337	2.8
F ₉	6.4027 + 1.8169X	0.9917	0.0510	4.3
F ₁₂	5.8548 + 1.5854X	0.9902	0.0602	5.0
F ₁₅	5.8359 + 1.1896X	0.9430	0.0883	7.4
F ₁₈	5.4199 + 1.1603X	0.9608	0.0947	7.9
F ₂₁	5.1972 + 0.7833X	0.9778	0.1151	9.6
F ₂₄	5.4574 + 0.5038X	0.9899	0.1332	11.1
F ₂₇	5.8764 + 0.9614X	0.9901	0.1612	13.4
F ₂₉	4.5086 + 1.7789X	0.9950	0.1889	15.7
F ₃₂	5.0374 + 0.7582X	0.9765	0.3208	26.7
F ₃₅	5.3817 + 0.9602X	0.9834	0.4004	33.4

2.2 抗戊唑醇菌系的生物学特性

2.2.1 致病力比较 :致病力测定结果(表 2)表明,抗性菌系和敏感菌系的致病力有显著差异。在冬前发病期,敏感菌系引起小麦植株发病程度较重,病情指数达 58.0,与抗性菌系(49.5)之间的差异达极显著水平($p < 0.01$),而经过越冬静止期,随着病害的发展,敏感菌系较抗性菌系的致病力明显减弱,前者的病情指数为 6.0 ~ 11.3,后者则达 20.0 ~ 77.0,两者之间差异也达到极显著水平($p < 0.01$)。由此说明,抗性菌系不仅其抗药性提高,其抗逆性较敏感品系显著增强,故在越冬后对小麦的危害加重。

2.2.2 菌丝生长比较 :在 PDA 培养基上,抗戊唑醇菌系和敏感菌系的菌丝生长差异较大(表 3),抗性菌系的气生菌丝较多,而敏感性菌丝无气生菌丝;抗性菌系的菌丝生长较慢,至 72h 菌丝直径仅达 3.080 cm;敏感菌系的菌丝生长速率快,至 72h 菌丝直径达 8.300 cm,可长满培养皿。延长培养时间,菌体代谢物引起培养基中部颜色发黑。在液体培养基中,敏感菌系的菌丝生长量也大于抗性菌系,生长至第 5 天,敏感菌系菌丝干重为

表 2 抗戊唑醇菌系和敏感性菌系的致病力比较

Table 2 Comparison of pathogenicities between resistant and sensitive tebuconazole of *R. cerealis*

菌株类型 Isolate type	播种后 15d 15 day after sowed		3 月中旬 Mid March		4 月中旬 Mid April		5 月中旬 Mid May	
	发病率 (%) Incidence	病情指数 Disease index	发病率 (%) Incidence	病情指数 Disease index	发病率 (%) Incidence	病情指数 Disease index	发病率 (%) Incidence	病情指数 Disease index
敏感菌系 Sensitive	84.0	58.0A	26.0	6.0B	42.0	8.0B	38.0	11.3B
抗性菌系 Resistant	72.0	49.5B	62.0	20.0A	92.0	56.0A	100.0	77.0A

注:表中竖向数据后不同字母表示差异极显著($p < 0.01$),下同。Note:The different letters in the same row mean significant difference at 0.01 probability level. The same for the following tables.

表 3 抗戊唑醇菌系与敏感性菌系的菌丝生长速率比较

Table 3 Comparison of growth rates between resistant and sensitive tebuconazole of *R. cerealis*

菌株类型 Isolate type	菌丝直径(cm) Diameter of mycelia			菌丝干重(g/bottle) Dry weight
	24h	48h	72h	
敏感菌株 Sensitive	1.926A	5.427A	8.300A	1.153A
抗性菌株 Resistant	0.945B	1.930B	3.080B	0.360B

1.153g,抗性菌系菌丝干重仅为0.3602g,差异极显著($p < 0.01$)。

2.2.3 产菌核能力比较:抗性菌系在菌核出现和形成时间上较敏感菌系均有延迟现象,前者菌核出现和形成时间分别为7天和14天,后者则分别为4天和12天;两者形成菌核的数量相差不大;但发现敏感菌系产生的菌核重量(11.0 mg/皿)较抗性菌系(32.45 mg/皿)小;菌核的形态及在培养皿中的分布也有明显差异,抗性菌系的菌核较大,易聚集在一起,分布于培养皿中部较多,敏感菌系的菌核较小,在培养基上散生,分布较均匀。

2.3 抗戊唑醇菌系的交互抗性

抗戊唑醇菌系对三唑酮、丙环唑、井冈霉素、福美双和噁醚唑5种药剂均产生很高程度的交互抗性,与敏感菌系相比,其交互抗性倍数分别为31.2、22.8、16.9、15.8和15.5倍;对咯菌腈的抗性仅为1.6倍,交互抗性不明显。戊唑醇、三唑酮、丙环唑和噁醚唑均为三唑类杀菌剂,该抗性菌系与前二种有显著的交互抗性,而对后者交互抗性有较大差异,其原因尚待进一步研究。另外,抗戊唑醇菌系对井冈霉素和福美双也产生显著的交互抗性。戊唑醇目前我国尚未广泛使用,现已发现禾谷丝核菌对该药的抗性发展速度快,交互抗性的范围大、程度高,在使用中应引起重视(表4)。

2.4 渗透压比较

敏感菌系和抗戊唑醇菌系在1%低渗透压下,其线性生长抑制率分别为-56.25%和-3.36%,在低渗透压环境下敏感菌系比抗性菌系更敏感;在4%中等渗透压环境中,抗性菌系的抑制率达57.6%,较敏感菌系(34.24%)敏感;在8%高渗透压下,抗性菌系的抑制率也高于敏感菌系。

表4 抗戊唑醇菌系对其它杀菌剂的交互抗性

Table 4 Cross resistance of resistant tebuconazole strain of *R. cerealis* to other fungicides

药剂 Fungicides	S-菌株 S-strain	R-戊唑醇 R-tebuconazole	抗性倍数 Resistance factor
戊唑醇 tebuconazole	0.0120	0.4004	33.4
三唑酮 tridimefon	0.0365	1.1397	31.2
丙环唑 propiconazole	0.0512	1.1688	22.8
井冈霉素 jinggangmycin	0.0417	0.7035	16.9
福美双 thiram	0.0503	0.8535	15.8
噁醚唑 difenoconazole	0.0541	0.8365	15.5
咯菌腈 fludioxonil	0.0500	0.0819	1.6

3 讨论

戊唑醇是1,2,4-三唑衍生物,它在结构上与三唑酮、三唑醇相似,作为三唑类杀菌剂的新成员,其在安全性、防治谱及适用范围等方面比三唑醇、三唑酮又有提高。目前尚无在田间产生抗药性的报道,但本研究证明,在室内一定的选择压力下,禾谷丝核菌对其抗性发生仍比较迅速,当选育至35代时,抗性可达33.4倍。同时发现,抗戊唑醇菌系不仅对同一类型的药剂三唑酮、丙环唑和噁醚唑有高水平的交互抗性(15.5~31.2倍),对抗生素类的井冈霉素和有机硫类的福美双也存在较高水平的交互抗性。说明禾谷丝核菌不仅对戊唑醇易产生高水平的抗性,而且抗性菌系对其它药剂间的交互抗性范围较广,这不仅是抗药性治理带来困难,也证明了禾谷丝核菌对该药的抗性风险性较大,应及早引起重视。

Hippe^[8]、李金玉^[9]的研究发现,三唑类杀菌剂可引起小麦白粉菌、锈菌的细胞壁无规则加厚。陈茹梅^[10]研究证明,戊唑醇能够引起纹枯菌细胞膜透性变化,细胞壁加厚。Eliss研究认为真菌对渗透压敏感是由于菌体质膜功能缺陷所致^[11]。本研究发现,抗戊唑醇菌系对渗透压变得更为敏感,该抗性菌在小麦播种期对幼苗侵染能力也有一定程度的下降,但抗逆能力却有显著增强,主要表现在越冬以后,该菌引起的发病率和严重度较敏感菌有显著提高。抗性菌系渗透压敏感性的变化所引起的利弊性尚需深入研究。

许多情况下病原物产生抗药性同时,由于遗传变异而表现其它生物学性状改变,影响抗药性菌系在自然界与敏感群体的竞争力。本研究证明,抗戊唑醇禾谷丝核菌系的生长、繁殖和致病力等生物学特性与敏感菌系相比差异较大。敏感菌系的菌丝的生长速度、产生菌核的速度均快于抗性菌系,这可能会直接影响抗性菌系与敏感菌系对寄主植物的生存竞争能力和抗逆性。

参 考 文 献

- 1 吴汉章,潘以楼,张敦阳. 烯唑醇春季施药防治小麦纹枯病的效果. 江苏农业科学,1991,(1):30-32
- 2 孔德生,王登甲. 三唑醇防治小麦纹枯病试验. 农药,1993,32(4):50
- 3 刘照烨. 三唑醇拌种对小麦纹枯病的药效. 农药,1994,33(3):46

- 4 王怀训,王开运,姜兴印,等. 立克秀防治小麦纹枯病的药效评价. 中国植物病害化学防治(第二卷). 北京:中国农业科技出版社,2000, 139 - 141
- 5 Aggarwal R. Raxil - a potent fungicide to control loose smut of wheat. Indian Phytopath. , 1993 ,46(2):172 - 173
- 6 Baloch T B, et al. Inhibition of ergosterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* and *Ustilago maydis* by tridemoph, fenpimirph and fenpropidin. Phytochemistry, 1984, 23(10):2219 - 2276
- 7 Cotterill P J. Evaluation of in furrow fungicide treatments to control rhizoctonia root rot of wheat. Crop Prot. ,1991,10(12):473 - 478
- 8 Hipper S. Ultrastructural change induced by the systemic fungicides triadimefon, nuarimol and imazilil nitrate in spordia of *Ustilago avenae*. Pestic. Sci. ,1984,15:210 - 214
- 9 李金玉,等. 种衣剂 17#包衣对小麦苗期白粉病菌发育影响的研究. 中国农业科学,1995,28(4):60 - 65
- 10 陈茹梅,李金玉,康振生,等. 戊唑醇对小麦纹枯菌超微结构的影响. 菌物系统,2000,19(3):389 - 395
- 11 Eliss S W, Grindle M, Lewis D H. Effect of osmotic stress on yield and poiylol content of dicarboximide-sensitive and -resistant strains of *Neurospora crassa*. Mycol. Res. ,1991,95(4):457 - 464

Resistance of *Rhizoctonia cerealis* to tebuconazole and the biological characters of tebuconazole-resistant strains

Liu Yinghua Wang Kaiyun Jiang Xingyin Yi Meiqin Wang Huaixun

(Department of Pesticide Sciences, College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

Abstract: The resistant strain of *R. cerealis* was selected after 35-times cultivation on the media containing tebuconazole, then the biological characters of the resistant and sensitive strains and the cross resistance of the resistant strain to some fungicides were studied. The results showed that after 35-times selection, the resistance of *Rhizoctonia cerealis* reached 33.4 fold to that of tebuconazole. Great difference in the rate of mycelial liner growth, dry weight of mycelial, number and dry weight of sclerotium were found between the resistant and sensitive strains. The pathogenicity of the resistant strain was weaker than the sensitive strain in winter wheat, but the incidence and sensitivity of the resistant strain were higher than that of sensitive strain in next spring. The cross resistance of resistant strain of *R. cerealis* to tridimefon, propiconazole, validamycin, thiram, difenoconazole and fludioxonil were 31.2, 22.8, 16.9, 15.8, 15.5 and 1.6 folds respectively.

Key words: *Rhizoctonia cerealis*; tebuconazole; resistance; biological characters; cross-resistance