

• 研究简报 •

灰葡萄孢菌对啮菌恶唑的敏感性基线及抗药突变体的诱导与生物学性状

马建英¹, 马志强^{* 2}, 王红刚², 王文桥², 韩秀英², 张小凤²

(1 河北农业大学 植物保护学院 农药系, 河北 保定 071001; 2 河北省农林科学院 植物保护研究所 / 河北省农业有害生物综合防治工程技术研究中心, 河北 保定 071000)

摘要: 从河北省不同地区未使用过啮菌恶唑的保护地中采集黄瓜或番茄灰霉病果、病叶, 经单孢分离获得 102 株灰葡萄孢菌, 采用菌丝生长速率法测定其对啮菌恶唑的敏感性, 所得 EC_{50} 值在 0.046 0~0.199 1 $\mu\text{g/mL}$ 之间, 平均为 $(0.118 2 \pm 0.036 3) \mu\text{g/mL}$, 其敏感性呈连续单峰曲线分布, 可作为灰葡萄孢菌对啮菌恶唑的敏感性基线。采用紫外线诱导获得了 7 株抗药突变体, 抗药突变体的菌落直径、菌丝干重、产孢量和致病性明显低于其亲本菌株, 继代培养 9 代后抗药突变体的抗药性倍数下降。

关键词: 灰葡萄孢菌; 啮菌恶唑; 敏感性基线; 抗药突变体; 生物学性状

中图分类号: S481.4

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2009)01-0141-04

Study on Baseline Sensitivity of *Botrytis cinerea* to SYP-Z048 and Induction and Biological Characteristics of Resistant Mutants

MA Jian-y ing¹, MA Zhi-qiang^{* 2}, WANG Hong-gang², WANG Wen-qiao²,
HAN X i-y ing², ZHANG X iao-feng²

(1. Department of Pesticide Science, Plant Protection College, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, Hebei Province, China; 2. IPM Centre of Hebei Province, Institute of Plant Protection, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Baoding 071000 Hebei Province, China)

Abstract A total of 102 single-spore isolates were collected from cucumber or tomato infected by *Botrytis cinerea* without exposure to SYP-Z048 in protected fields in different regions of Hebei Province. The sensitivity of the isolates was determined by mycelial growth rate inhibition tests. The EC_{50} value distributed as a unimodal curve, which ranging from 0.046 0 $\mu\text{g/mL}$ to 0.199 1 $\mu\text{g/mL}$, with a mean value of $(0.118 2 \pm 0.036 3) \mu\text{g/mL}$. The data could be used as baseline sensitivity of *B. cinerea* to SYP-Z048. Seven SYP-Z048-resistant mutants were obtained through ultraviolet radiation. The colonies diameter, mycelial weight, sporulation and pathogenicity ability of resistant mutants were significantly lower than that of parental isolates. The resistance rate of resistant mutants receded after nine incubations.

Key words *Botrytis cinerea*; SYP-Z048; baseline sensitivity; resistant mutants; biological characteristics

收稿日期: 2008-08-12 修回日期: 2008-12-16

作者简介: 马建英 (1982-), 女, 河北曲周人, 在读硕士研究生, E-mail: majianying@china.com.cn * 通讯作者 (Author for correspondence): 马志强 (1959-), 男, 河北保定人, 研究员, 主要从事植物病原菌抗药性及杀菌剂应用研究。联系电话: 0312-5915658 E-mail: funglal@heinfanet

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目 (2006BAD08A03-2)

灰霉病是由灰葡萄孢菌 *Botrytis cinerea* Pers 引起的一种世界性病害,该病菌寄主范围广,可引起多种作物的灰霉病。目前我国防治灰霉病的杀菌剂主要为二甲酰亚胺类的腐霉利、N-苯氨基甲酸酯类的乙霉威和氨基嘧啶类的嘧霉胺,但灰葡萄孢菌对上述药剂均已产生了不同程度的抗药性^[1~4]。

由沈阳化工研究院研制的啉菌[®]唑 [N-甲基-3-(4-氯)苯基-5-甲基-5-吡啶-3-基-噁唑啉] 是一种结构新颖的杀菌剂。该药剂对于子囊菌、担子菌和半知菌门真菌引起的病害有效,尤其是对灰葡萄孢菌有特效^[5]。目前已经有商品化药剂 25% 菌思奇乳油应用于灰霉病的防治。本研究建立了灰葡萄孢菌对啉菌[®]唑的敏感性基线,并比较了抗药突变体与亲本菌株的生物学性状,以评估其抗药性风险。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试药剂: 93.2% 的啉菌[®]唑 (SY P-Z048) 原药 (沈阳化工研究院提供)。供试番茄品种: 佳粉 15 为易感灰霉病品种。供试菌株: 从河北省保定、廊坊、承德、衡水 4 地未使用过啉菌[®]唑的保护地中采集黄瓜或番茄灰霉病果、病叶,经单孢分离获得灰葡萄孢菌。

1.2 实验方法

1.2.1 灰葡萄孢菌对啉菌[®]唑的敏感性测定

采用菌丝生长速率法,按文献[6]的方法进行。

1.2.2 紫外线诱导灰葡萄孢菌对啉菌[®]唑的抗药性 参照 Bruin 等^[7]的方法。将供试亲本菌株的孢子悬浮液均匀涂于含啉菌[®]唑 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 平板上,于 25W 紫外灯下 25 cm 处照射 120 s 每处理 3 皿。把能在含药平板上正常生长的菌碟挑到无药 PDA 平板上,培养 4 d 后测定其对啉菌[®]唑的敏感性。

1.2.3 抗药突变体与其亲本菌株的生物学特征研究

1.2.3.1 菌落直径、菌丝干重、产孢量及致病性测定 分别将抗药突变体和亲本菌株的菌碟置于 PDA 平板中央,每皿 1 个菌碟,每处理 3 次重复,3 d 后测量菌落直径;分别将其菌碟接入装有 120 mL 马铃薯葡萄糖 (PD) 培养液的三角瓶中,振荡培养 5 d 后,过滤菌丝,真空抽滤称量菌丝干重;在恒温培养 7 d 的 PDA 平板上滴加 10 μL 吐温-80 洗下分生孢子,定容至 10 mL,采用血球计

数板计算孢子悬浮液的浓度。采用离体叶片法^[8]进行致病性测定。将其孢子悬浮液接种到番茄复叶的叶片上,每片叶子接种 20 μL 。

1.2.3.2 抗药遗传稳定性测定 将抗药突变体和其亲本菌株在无药 PDA 平板上以菌丝体继代培养 9 代,按 1.2.1 节方法测定其敏感性。

2 结果与分析

2.1 灰葡萄孢菌对啉菌[®]唑的敏感性

啉菌[®]唑对 102 株灰葡萄孢菌的 EC_{50} 值最低为 0.046 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 最高为 0.199 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 平均 EC_{50} 值为 (0.118 2 $\pm$ 0.036 3) $\mu\text{g}/\text{mL}$, 敏感性呈类似正态分布,可作为啉菌[®]唑对灰葡萄孢菌的敏感基线 (图 1)。

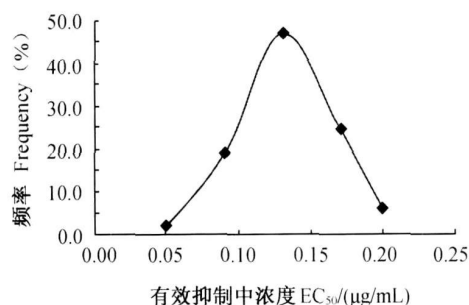


图 1 102 株灰葡萄孢菌对啉菌[®]唑的敏感性的分布频率

Fig 1 The sensitivity frequency of 102 isolates of *Botrytis cinerea* to SY P-Z048

2.2 紫外线诱导抗药性

5 个亲本菌株经紫外线照射后,分离获得 7 个突变菌株,经测定,其抗药性倍数分别为 9.2、16.1、20.3、39.5、37.1、14.2 和 13.4 (表 1),表明亲本菌株都产生了不同程度的变异,表现出相当的抗性。

2.3 菌落直径、菌丝干重和产孢量比较

通过表 2 可以看出,抗药突变体的菌落直径、菌丝干重及产孢量都明显低于其亲本菌株,说明在离体条件下,抗药突变体的生长繁殖能力降低。

2.4 致病性比较

由表 3 可知,抗药突变体和亲本菌株都是在接种 24 h 后开始发病,接种 72 h 后,除亲本菌株 B-045 发病率为 97.22% 外,其他 4 株亲本菌株的发病率达 100%。接种 96 h 后病斑面积达到最大值。在接种 144 h 后,各菌株开始产孢,产孢量都达到了 0.9×10^7 个 $/\text{mL}$ 以上,萌发率最低也达到 68%。

表 1 紫外线诱导获得的抗吡菌恶唑突变体的敏感性

Table 1 The sensitivity of SYP-Z048 resistant mutants obtained through ultraviolet radiation to SYP-Z048

菌株 Isolates	抑制中浓度 EC ₅₀ /(μg/mL)	抗性倍数 Resistance rate	菌株 Isolates	抑制中浓度 EC ₅₀ /(μg/mL)	抗性倍数 Resistance rate
B-011	0.070 7	—	B-028	0.070 4	—
B-011-uv-08	0.649 7	9.2	B-028-uv-15	2.613 8	37.1
B-011-uv-13	1.135 2	16.1	B-040	0.079 4	—
B-097	0.060 6	—	B-040-uv-09	1.124 6	14.2
B-097-uv-05	1.230 0	20.3	B-045	0.082 4	—
B-097-uv-11	2.390 8	39.5	B-045-uv-20	1.104 6	13.4

注: 抗性倍数 = 抗药突变体菌株的 EC₅₀ 值 / 亲本菌株 EC₅₀ 值。下同。
Note: Resistance rate = EC₅₀ of resistant mutants isolate / EC₅₀ of parental isolate. The same as below.

表 2 灰葡萄孢菌对吡菌恶唑的亲本菌株与抗药突变体的菌落直径、菌丝干重和产孢量的比较

Table 2 Comparison of colonies diameter, mycelial weight and sporulation of parental isolates and resistant mutants of Botrytis cinerea to SYP-Z048

菌株 Isolates	菌落直径 Colonies diameter/mm	菌丝干重 Mycelial weight/g	产孢量 Sporulation / (×10 ⁷ 个/mL)	菌株 Isolates	菌落直径 Colonies diameter/mm	菌丝干重 Mycelial weight/g	产孢量 Sporulation / (×10 ⁷ 个/mL)
B-011	74.8 a	1.853 4 a	1.766 7 a	B-028	75.7 a	1.860 9 a	1.866 7 a
B-011-uv-08	64.5 b	1.375 5 b	0.800 0 b	B-028-uv-15	61.2 b	1.420 5 b	1.166 7 b
B-011-uv-13	64.2 b	1.365 8 b	0.866 7 b	B-040	74.6 a	1.947 2 a	1.533 3 a
B-097	71.3 a	1.953 5 a	1.666 7 a	B-040-uv-09	60.6 b	1.496 2 b	0.833 3 b
B-097-uv-05	62.9 b	1.529 9 b	0.600 0 b	B-045	74.6 a	1.753 9 a	1.866 7 a
B-097-uv-11	60.6 c	1.504 5 c	0.500 0 b	B-045-uv-20	60.6 b	1.127 8 b	1.133 3 b

注: 根据 Duncan's 最小显著性差异测定, 同列中数值后标有不同字母表示数值之间差异显著 (P = 0.05)。下同。
Note: Values in a column followed by different letters are significantly different according to Duncan's test (P = 0.05). The same as below.

表 3 灰葡萄孢菌对吡菌恶唑的亲本菌株与抗药突变体的致病性比较

Table 3 Pathogenicity comparison of parental isolates and resistant mutants of Botrytis cinerea to SYP-Z048

菌株 Isolates	病斑直径 Diameter of disease spot/mm				发病率 Infection ratio(%)			产孢时间 Sporulation time/h	产孢量 Sporulation / (×10 ⁷ 个/mL)	孢子萌发率 Rate of sporogemination (%)
	24 h	48 h	72 h	96 h	24 h	48 h	72 h			
B-011	4.4 a	9.6 a	18.5 a	33.3 a	63.89 a	80.55 a	100.00 a	144	1.8000 a	96.11 a
B-011-uv-08	3.6 c	7.1 b	11.4 b	25.4 b	36.11 b	52.78 c	86.11 b	144	0.9667 b	79.56 c
B-011-uv-13	3.5 b	7.0 b	11.7 b	20.8 c	41.67 b	63.89 b	75.00 c	144	0.9000 b	81.40 b
B-028	4.9 a	6.5 a	10.9 a	18.9 a	69.44 a	88.89 a	100.00 a	144	2.1330 a	91.80 a
B-028-uv-15	3.6 b	4.4 b	8.4 b	10.8 b	44.44 b	63.89 b	75.00 b	144	1.4000 b	67.99 b
B-040	5.0 a	6.4 a	10.3 a	16.9 a	61.11 a	86.11 a	100.00 a	144	2.1333 a	88.90 a
B-040-uv-09	4.4 b	5.2 b	8.3 b	12.4 b	36.11 b	63.89 b	87.33 b	144	1.5667 b	73.33 b
B-045	3.6 a	4.4 a	7.2 a	11.3 a	75.00 a	86.11 a	97.22 a	144	2.0667 a	94.78 a
B-045-uv-20	3.1 b	3.9 b	5.4 b	8.8 b	47.22 b	63.89 b	80.56 b	144	1.1333 b	74.45 b
B-097	5.0 a	5.7 a	9.4 a	17.7 a	77.78 a	88.89 a	100.00 a	144	2.3000 a	89.84 a
B-097-uv-05	3.5 b	4.9 b	7.3 b	11.5 b	47.22 b	63.89 b	88.89 b	144	1.2667 b	74.75 b
B-097-uv-11	3.5 b	4.8 b	6.9 c	10.7 c	36.11 c	61.11 b	83.33 b	144	1.0333 c	73.36 c

2.5 抗药遗传稳定性

测定结果表明 (表 4), 随着培养代数的增加, 抗药突变体和亲本菌株对吡菌恶唑的敏感性

也随之增加。继代培养到第 9 代, 抗药性倍数分别降低到 1.71、8.66、19.19、6.33、7.81、9.10 和 22.47。

表 4 抗药突变体抗药遗传稳定性测定

Table 4 Resistance descendibility of resistant mutants of *Botrytis cinerea* to SYP-Z 048

菌株 Iso lates	[EC ₅₀ / (μg/mL)] / 抗药性倍数 (Resistance rate)				
	第 1 代 The first generation	第 3 代 The third generation	第 5 代 The fifth generation	第 7 代 The seventh generation	第 9 代 The ninth generation
B-011	0.07	0.07	0.06	0.05	0.05
B-011-uv-08	0.65/9.19	0.60/8.55	0.43/6.60	0.16/2.92	0.08/1.71
B-011-uv-13	1.14/16.06	1.00/14.33	0.76/11.69	0.59/10.90	0.43/8.66
B-028	0.07	0.07	0.07	0.06	0.05
B-028-uv-15	2.61/37.13	2.55/36.66	2.01/29.84	1.60/25.20	1.02/19.19
B-040	0.08	0.08	0.07	0.06	0.04
B-040-uv-09	1.12/14.16	1.11/14.10	0.96/13.01	0.64/10.32	0.25/6.33
B-045	0.08	0.07	0.07	0.06	0.05
B-045-uv-20	1.10/13.41	0.97/13.30	0.85/12.37	0.65/10.60	0.36/7.81
B-097	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06
B-097-uv-05	1.23/20.30	1.21/20.18	0.95/15.79	0.75/12.89	0.52/9.10
B-097-uv-11	2.39/39.45	2.26/37.54	1.96/32.61	1.75/29.95	1.30/22.47

3 讨论

植物病原菌对杀菌剂的抗药性风险因子多且复杂,可来自药剂的选择压、药剂对病原菌的作用机制,也可来自植物病原菌群体的变异、抗药突变体的适合度、病原菌对不同作用机制药剂的交互抗性等^[9]。本研究以 7 株灰葡萄孢菌对啉菌恶唑的抗药突变体,与其亲本菌株在菌落直径、菌丝干重及产孢量等方面进行比较,再次证实了抗药突变体竞争力明显低于其亲本菌株的结果,支持了赵平和司乃国等^[10]用离体叶片法测定的结果,即活体上抗药突变体明显弱于其亲本菌株,不利于抗药群体的形成;而抗药突变体的抗药水平均随培养代数的增加而降低,说明突变体抗药遗传稳定性比较差。由上述两方面可推测灰葡萄孢菌对啉菌恶唑抗药突变体在失去药剂选择压的情况下,难以发展成为优势菌株,由此初步评价灰葡萄孢菌对啉菌恶唑具有较低或中等的抗性风险。

生产中单一和过量用药,病菌繁殖周期短、产孢量大等都有利于病菌抗药性的产生。灰葡萄孢菌是典型的易产生抗药性的病菌^[9],而啉菌恶唑又是防治该病的新型杀菌剂。在生产上尚未大量应用前,应进一步探索其作用机制,明确该药是否与其他不同类型的杀菌剂存在交互抗性,以便全面评估其应用前景,为生产上科学用药提供理论依据。

参考文献:

[1] DING Zhong(丁中), LIU Feng(刘峰), MU Li-yi(慕立义). 不同抗性型灰葡萄孢菌 *Botrytis cinerea* 对不同作用机制杀

菌剂的敏感性研究 [J]. Chin J Pestic Sci (农药学报), 2001, 12(3): 59-63.

[2] HAN Ju-cai(韩巨才), YAN Xi-qin(闫秀琴), LIU Hu+ping(刘慧平), et al. 灰霉病原菌对速克灵的抗性监测 [J]. J Shanxi Agric Univ (山西农业大学学报), 2003, 23(4): 299-302

[3] MOYANO C, GOMEZ V, MELGAREJO P. Resistance to Pyrimethanil and other Fungicides in *Botrytis cinerea* Populations Collected on Vegetable Crops in Spain [J]. J Phytopathology, 2004, 152: 484-490

[4] YIN Hong-mei(印红梅), LI Qi-an(李茜), LI Hong-ye(李红叶). 浙江省茄科蔬菜灰葡萄孢菌对啉霉胺的抗性 [J]. Acta Agricul turae Zhejiangensis (浙江农业学报), 2007, 19(2): 123-126.

[5] SIN ai-guo(司乃国), ZHANG Zong-jian(张宗俭), LIU Jun-li(刘君丽), et al. 创制杀菌剂啉菌恶唑生物活性及应用研究 (I)——番茄灰霉病 [J]. Chinese J Pestic (农药), 2004, 43(1): 16-18.

[6] HAN Ju-cai(韩巨才), LIU Hu+ping(刘慧平), YAN Xi-qin(闫秀琴), et al. 灰葡萄孢菌对三种杀菌剂的抗性表现型分布及稳定性测定 [J]. Chin J Pestic Sci (农药学报), 2004, 6(3): 43-47.

[7] BRUN G C A, EDG NGTON L V. Induction of Fungal Resistance to Metalaxyl by Ultraviolet Irradiation [J]. Phytopathology, 1982, 72: 1209-1212.

[8] YANG Tao(杨涛), GUAN Tian-shu(关天舒), BAI Jin-kai(白金铠). 番茄叶霉病菌抗药性研究 [J]. Liaoning Agric Sci (辽宁农业科学), 2002 (4): 17-18

[9] WANG Wen-qiao(王文桥), MA Zhi-qiang(马志强), ZHANG Xiao-feng(张小风). 植物病原菌对杀菌剂的抗性风险评估 [J]. Chin J Pestic Sci(农药学报), 2001, 3(1): 6-11

[10] ZHAO Ping(赵平), SIN ai-guo(司乃国), LIU Jun-li(刘君丽), et al. 灰葡萄孢菌对啉菌恶唑的抗药性研究初报 [J]. Chinese J Pestic (农药), 2005, 44(4): 180-183

(Ed. JIN SH)