

• 研究论文 •

设施蔬菜灰霉病菌对不同类型 杀菌剂的抗性检测

张传清^{1,2}, 张雅², 魏方林¹, 刘少颖¹, 朱国念^{1*}

(1. 浙江大学 农业与生物技术学院, 浙江 杭州 310029; 2. 杭州市农业科学研究院, 浙江 杭州 310024)

摘要: 为了明确设施蔬菜灰霉病菌 *Botryotinia fuckeliana* 的抗药性现状, 采用菌丝生长速率法检测了 2005~2006 年采自浙江、江苏、山东和辽宁 4 省的 144 个菌株对 6 种常用防治药剂的敏感性。结果表明, 灰霉病菌对百菌清已经产生了低水平的抗性, 频率为 5.56%, 其对多菌灵的抗性非常严重, 总的抗性频率为 43.05%, 高抗 (HR) 频率为 27.08%; 乙霉威的 EC_{50} 值在 0.137~728.9 $\mu\text{g/mL}$ 之间, 平均为 40.06 $\mu\text{g/mL}$ 。其中多菌灵-乙霉威双抗频率为 36.11%, 且首次检测到了两种新的双抗类型。二甲酰亚胺类杀菌剂在生产上已经应用近 20 年, 但灰霉病菌对异菌脲和腐霉利只有频率为 20% 左右的低水平抗性, 没有检测到高抗菌株; 苯胺嘧啶类杀菌剂嘧霉胺虽然只应用几年时间, 但已经产生了抗性, 其抗性菌株频率为 4.16%。研究表明, 设施蔬菜灰霉病菌对常用的 6 种防治药剂均产生了不同程度的抗性。

关键词: 设施蔬菜; 灰霉病菌; 杀菌剂; 抗药性检测; 田间抗药性

中图分类号: S481.4 S482.2

文献标识码: A

文章编号: 1008-7303(2006)03-0245-05

Detection of Resistance of *Botryotinia fuckeliana* from Protected Vegetables to Different Classes of Fungicides

ZHANG Chuan-qing^{1,2}, ZHANG Ya², WEI Fang-lin¹, LIU Shao-ying¹, ZHU Guo-nian^{1*}

(1. College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;

2 Hangzhou Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310024, China)

Abstract For understanding the status of fungicide resistance in *Botryotinia fuckeliana* of protected vegetables, the sensitivities of 144 isolates collected from Zhejiang, Jiangsu, Liaoning and Shandong during 2005~2006 to six fungicides were evaluated. Results showed that low-level of resistance to chlorothalonil emerged with a frequency of 5.56%. Serious resistance of *B. fuckeliana* to carbendazim was detected with a frequency of highly-resistant sub-population of 27.08% and total resistance frequency of 43.05%. Meanwhile, medium effective concentrations (EC_{50}) of inhibiting radial growth for diethofencarb ranged from 0.137 $\mu\text{g/mL}$ to 728.9 $\mu\text{g/mL}$ with a mean value of 40.06 $\mu\text{g/mL}$. Frequency of double-resistance to carbendazim and diethofencarb was as high as 36.11%. Meanwhile, two new phenotypes of double-resistance were reported. Only low-level resistance to iprodione or procymidone with frequency of about 20% was detected and no highly resistant isolates were detected.

收稿日期: 2006-03-27 修回日期: 2006-05-29

作者简介: 张传清 (1977-), 助理研究员, 从事杀菌剂应用与开发研究; * 通讯作者: 朱国念 (1957-), 男, 博士, 教授, 从事农药应用与开发研究; 联系电话: 0571-86971220 E-mail: zhuguan@zju.edu.cn; cqzhang9603@zju.edu.cn

基金项目: 第 38 批中国博士后科学基金 (2005038641) 资助。

although the dicarboximides had been used in practice for about 20 years in China. Moreover, resistance to pyrimethanil occurred with a frequency of 4.16% just a few years after its application in the sampled regions. The results indicated that serious and complex resistance problem to the six fungicides had emerged in *B. fuckeliana* of protected vegetables.

Key words protected vegetables; *Botryotinia fuckeliana*; fungicide; resistance detection; field resistance

灰霉病是由葡萄孢属真菌引起(主要为灰葡萄孢霉 *Botrytis cinerea*, 有性世代为富克尔核盘菌 *Botryotinia fuckeliana*)的一种世界性的重要病害^[1]。迄今为止, 尚未发现对灰霉病具有抗性的作物品种, 因此生产上一直依赖于化学防治^[2]。目前, 用于防治灰霉病的药剂主要有苯并咪唑类(包括多菌灵和甲基硫菌灵)、二甲酰亚胺类(包括腐霉利和异菌脲等)、N-苯氨基甲酸酯类(主要为乙霉威)、百菌清和苯氨基嘧啶类杀菌剂(主要为嘧霉胺)^[3]。其中苯并咪唑类的应用历史最长, 二甲酰亚胺类次之, 乙霉威与苯并咪唑类杀菌剂间负交互抗性的应用^[4]也有近 10 年的历史, 百菌清是最重要的非专业化性药剂, 嘧霉胺则是 20 世纪末才投入使用^[5]的。二甲酰亚胺类和乙霉威是目前防治灰霉病的骨干药剂。

灰霉病菌因具有寄主范围广、繁殖快和遗传变异频繁等特点, 使其极易对杀菌剂产生抗性^[2]。自 1971 年荷兰首次报道仙客来灰霉病菌对多菌灵已产生抗性以来^[6], 欧洲各国和以色列对葡萄及花卉上灰霉病的抗药性作了系统及及时的报道^[2, 7-9], 但大多是以葡萄、花卉和果树上的灰霉病菌为研究对象, 未见对蔬菜尤其是设施蔬菜上灰霉病抗药性的系统研究报道。国内自周明国等 1987 年首次检测到多菌灵抗性菌株以来^[10], 已先后报道了其对苯并咪唑类、二甲酰亚胺类、N-苯氨基甲酸酯类和苯氨基嘧啶类杀菌剂的抗性^[3, 11, 12]。但已有研究往往局限于一种或少数几种化合物, 而市场上可供选择的药剂单剂就有 10 余种, 对生产的指导意义有很大的局限性。作者以百菌清、多菌灵、腐霉利、异菌脲、乙霉威和嘧霉胺为对象, 全面地检测了灰霉病菌的抗药性。

1 材料与方法

1.1 供试菌株及其培养

144 株灰霉病菌 *Botryotinia fuckeliana* 为 2005 ~ 2006 年采自浙江、江苏、辽宁和山东 4 地设施蔬菜上的单分生孢子菌株, 在 4℃ 下保存于 PDA (马

铃薯葡萄糖琼脂)斜面上。

1.2 供试药剂

95% 百菌清 (chlorothalonil)、98% 多菌灵 (carbendazim)、98.1% 腐霉利 (procydione)、96% 异菌脲 (iprodione)、95.2% 乙霉威 (diethofencarb) 和 98% 嘧霉胺 (pyrimethanil) 原药, 均由农业部农药检定所提供。除多菌灵用 0.1 mol/L 的盐酸溶解外, 其余均用丙酮溶解, 配制成 10 mg/mL 的母液备用。

1.3 抗性的定性测定

采用区分剂量法^[8]。多菌灵和乙霉威的区分剂量设置为 5、10 和 100 $\mu\text{g/mL}$; 腐霉利和异菌脲设置为 5 $\mu\text{g/mL}$ 。各平板上最终所含丙酮质量分数均小于 1.0%。以不含药剂者为对照 (CK), 每处理重复 3 次。各菌株先分别在 PDA 平板上培养 5 d 再在同一圆周上制取菌丝块 (直径 0.5 cm), 并将其转移到含不同浓度药剂的 PDA 平板中央。培养 3 d 后观察生长情况: 不能在 5 $\mu\text{g/mL}$ 的多菌灵或乙霉威平板上生长的为敏感菌株, 能在 5 $\mu\text{g/mL}$ 而不能在 10 $\mu\text{g/mL}$ 上生长的为多菌灵或乙霉威低水平抗性菌株, 能在 10 $\mu\text{g/mL}$ 而不能在 100 $\mu\text{g/mL}$ 上生长的为中等水平抗性菌株, 能在 100 $\mu\text{g/mL}$ 上生长的为高水平抗性菌株; 不能在 5 $\mu\text{g/mL}$ 腐霉利或异菌脲平板上生长的菌株为腐霉利或异菌脲敏感菌株, 反之则为抗性菌株^[2, 3, 8]。

1.4 抗性的定量测定

1.4.1 有效抑制中浓度 (EC_{50}) 的测定 根据 1.3 节的结果相应设置乙霉威、腐霉利和异菌脲 5~7 个测试浓度; 百菌清的浓度设置为 30.00、15.00、5.00、1.25、0.31 和 0.08 $\mu\text{g/mL}$; 嘧霉胺的浓度设置为 1.00、0.50、0.25、0.13、0.06、0.03 和 0.02 $\mu\text{g/mL}$ 。其余同 1.3 节。除嘧霉胺的测定采用 L-A 合成培养基 (K_2HPO_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g, KCl 0.5 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, L-A 2 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 去离子水 1 L) 外, 其他测定都采用 PDA 培养基于 23℃ 下在黑暗中进行。

培养 3 d后测量各处理的菌落直径 (cm), 取平均值由 (1)式计算抑制率 (%), 通过浓度对数值 (X) 和抑制率机率值 (Y) 之间的线性回归关系求出毒力回归方程和 EC_{50} 值。

$$\text{抑制率}(\%) = [(\text{CK 的菌落直径} - \text{处理的菌落直径}) / (\text{CK 的菌落直径} - 0.5)] \times 100 \quad (1)$$

1. 4. 2 敏感性分布图的制作 将病菌群体对供试药剂的敏感性 (EC_{50} 值)从低到高分成 10个左右的区间,统计 EC_{50} 值在各个区间的菌株占整个群体的百分比 (%), 即频率 (frequency)。以 EC_{50} 值为 X 轴, 相应的频率 (%) 为 Y 轴, 即得病原菌群体对该药剂的敏感性分布图。

1. 5 数据处理

数据处理与分析采用 EXCEL 和 DPS 软件进行。

2 结果与分析

2. 1 灰霉病菌群体对百菌清的敏感性

病原菌群体对百菌清的敏感性出现了明显的分化, 144 个菌株的 EC_{50} 值在 0. 004 ~ 30 37 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间, 平均为 3. 38 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (图 1)。结果表明, 灰霉病菌对百菌清已产生了低水平抗性^[13] (EC_{50} 值大于平均值的 5倍, 即 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 抗性频率为 5 56%。

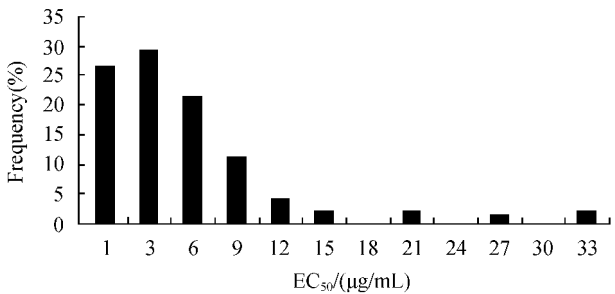


Fig. 1 Sensitivity of *B. fuckeliana* population to chlorothalonil

2. 2 灰霉病菌群体对多菌灵的敏感性

病原菌群体对多菌灵的抗性非常严重 (图 2), 总的抗性频率为 70. 83%, 其中高抗 (HR) 频率达 27. 08%。

2. 3 灰霉病菌群体对乙霉威的敏感性

供试群体对乙霉威的敏感性差异显著, EC_{50} 值在 0. 1~ 728. 9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间, 平均为 40. 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。可以划分成 3 种类型^[8]: 敏感菌株——不能在 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 上生长; 中抗菌株——能在 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 上

生长, EC_{50} 值在 20~ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间; 高抗菌株—— EC_{50} 值大于 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (图 3, 表 1)。

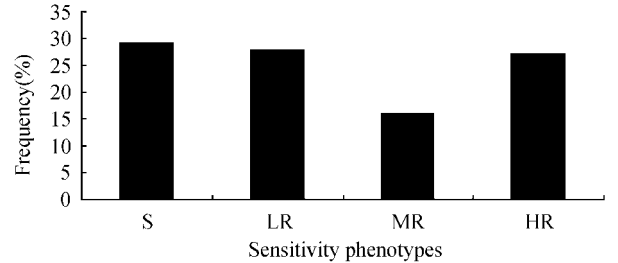


Fig. 2 Resistance of *B. fuckeliana* to carbendazim
Note The letters “S”, “R”, “LR”, “MR” and “HR” indicated sensitive, resistant, lowly resistant, moderately resistant and highly resistant, respectively.

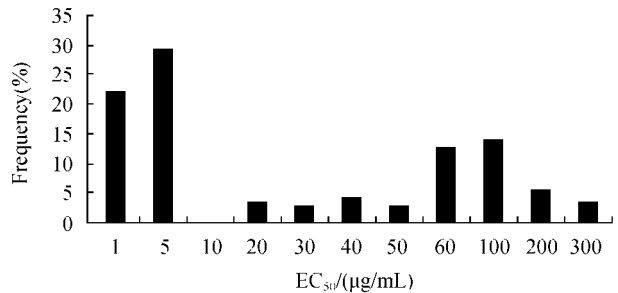


Fig. 3 Sensitivity of *B. fuckeliana* population to diethofencarb

2. 4 灰霉病菌群体对多菌灵-乙霉威的双重抗性

病原菌群体中多菌灵-乙霉威双重抗性亚群体的比例已经非常高, 频率为 36. 11%。包括 CaMR-D iMR、CaMR-D iHR 和 CaHR-D iHR 3 种类型, 频率分别为 4. 17%、13. 19% 和 18. 75%, 没有检测到表型为 CaLR-D iR 和 CaHR-D iMR 的双抗菌株 (表 1)。

2. 5 灰霉病菌群体对异菌脲和腐霉利的敏感性

异菌脲对病原菌群体的 EC_{50} 值在 0. 06~ 3. 76 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间, 平均为 1. 08 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (图 4), 腐霉利的 EC_{50} 值在 0. 18~ 5. 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间, 平均为 1. 57 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (图 5)。说明病菌群体对异菌脲的敏感性要略高于对腐霉利的敏感性。

根据各菌株在 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的药剂本板上能否生长及其 EC_{50} 值, 可将供试的 144 株灰霉病菌对异

Table 1 Double-resistance to carbendazim and diethofencarb in *B. cinerea*

Phenotypes ^a	No. of isolates	Frequency (%)	Range of EC ₅₀ values		Mean EC ₅₀ values	
			/(μg/mL)		/(μg/mL)	
CarS-D ieS	4	2.78	1.7~16.2		6.2±5.4 ^{**}	
CarS-D iMR	5	3.47	26.8~51.3		30.1±11.9	
CarS-D iHR	20	13.89	52.6~165.4		102.9±13.4	
CaMR-D ieS	6	4.17	2.3~6.9		3.2±1.6	
CaMR-D iMR	6	4.17	29.1~63.7		44.3±9.5	
CaMR-D iHR	19	13.19	79.1~728.9		134.5±54.7	
CaHR-D ieS	57	39.58	0.1~5.1		2.7±1.3	
CaHR-D iMR	0	0.00	—		—	
CaHR-D iHR	27	18.75	99.8~140.2		113.2±13.5	
Total	144	100.00	0.1~728.9		40.1±30.6	

^a Car= carbendazim, D ie= diethofencarb. ^{**} Average±SD.

菌脲和腐霉利的敏感性划分为两种类型^[8]：敏感菌株——不能在 5 μg/mL 上生长，EC₅₀ 值小于 2 μg/mL (异菌脲) 或 1.5 μg/mL (腐霉利)；低水平抗性菌株——能在 5 μg/mL 上生长，EC₅₀ 值介于 2.00~3.76 μg/mL 之间 (异菌脲) 或介于 2.30~5.35 μg/mL 之间 (腐霉利)。异菌脲和腐霉利低水平抗性的频率分别为 22.92% 和 18.06% (图 4, 图 5)。

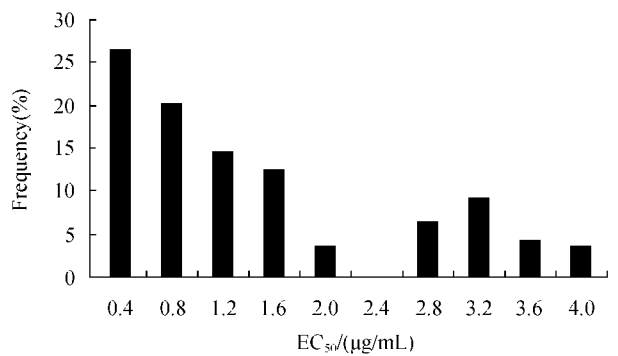


Fig. 4 Sensitivity of *B. fuckeliana* population to iprodione

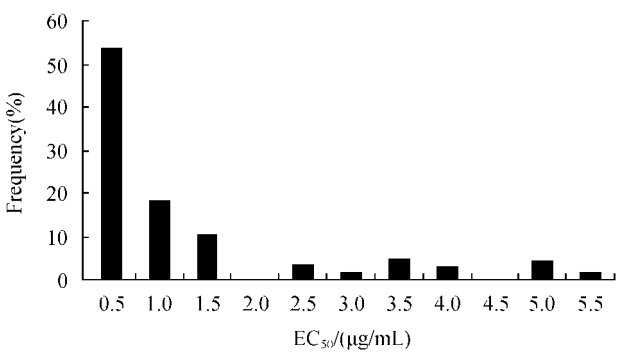


Fig. 5 Sensitivity of *B. fuckeliana* population to procymidone

2.6 灰霉病菌群体对啞霉胺的敏感性

根据贾晓华建立的敏感基线、抗性划分标准

和本研究中的敏感性分布^[3]，共检测到 3 种类型的菌株：S (EC₅₀ < 0.60 μg/mL)、LR (EC₅₀ 值介于 0.60~1.20 μg/mL) 和 MR (EC₅₀ 值介于 1.20~1.73 μg/mL)，总的抗性频率为 4.16%。整个群体的 EC₅₀ 值在 0.004~1.730 μg/mL 之间，平均为 0.20 μg/mL (图 6)。

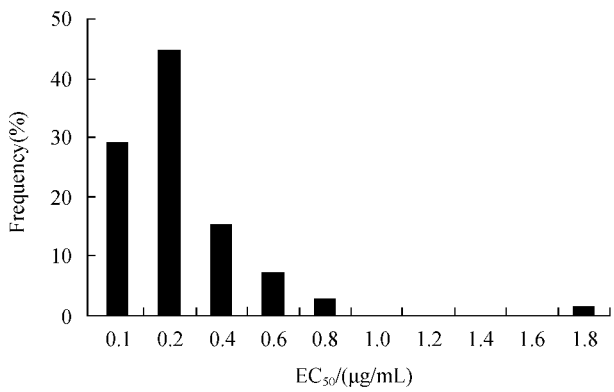


Fig. 6 Sensitivity of *B. fuckeliana* population to pyrimethanil

3 讨论

本研究针对有关灰霉病菌抗药性研究中药剂种类少、病原菌样本缺乏足够的代表性等情况^[10~12]，全面地研究了采自浙江、江苏、辽宁和山东 4 地病菌群体对目前常用的 6 种药剂的敏感性。结果表明，灰霉病菌对多菌灵已产生非常严重的抗性，其中高水平抗性 (HR) 亚群体已经成为优势群体。鉴于多菌灵、甲基硫菌灵和苯菌灵等之间具有正交互抗性^[2,6,8]，笔者认为苯并咪唑类药剂已经失去使用价值，继续使用这类药剂，不但会显著增加经济和环境成本，也无法获得满意的防治效果。

某些病原菌对苯并咪唑类药剂产生高水平抗

性的同时却对乙霉威非常敏感。乙霉威在苯并咪唑类抗性治理中的应用,是最为成功的负交互抗性事例^[4]。但本研究发现病原菌群体中多菌灵-乙霉威双重抗性亚群体的比例已高达 36.1%。国内外也有过类似的报道^[2,8]。根据这一结果,笔者认为应该限制单独使用乙霉威,减少多菌灵-乙霉威复配制剂的使用,更多地考虑乙霉威与其他类型药剂的轮用。同时,国外有关多菌灵-乙霉威双重抗性是指双高抗 (CaHR-DiHR)^[2,8],本研究首次报道了多菌灵中抗 (CaMR)-乙霉威中抗 (DiMR)和多菌灵中抗 (CaMR)-乙霉威高抗 (DiHR)这两种双重抗性类型。对其分子遗传学基础还有待进一步的研究。

二甲酰亚胺类杀菌剂在生产上已经应用了近 20 年,但已有的研究表明,只有频率为 20% 左右的低水平抗性,且这些低水平抗性菌株的 EC_{50} 值仍然比较低,说明这类药剂的田间抗性风险比较低^[2]。虽然在实验室条件下很容易获得其高水平抗药性 (HR) 突变体,但这些 HR 突变体对渗透压具有高的敏感性而表现出低的适合度^[2,3]。与此一致的是,本研究中也检测不到 HR 菌株。但是,这类杀菌剂继续在生产上大量使用是否会使抗性频率增加,是否会选择出高水平抗性亚群体还有待继续进行监测。这一结果同时提醒我们:在进行杀菌剂抗性风险评估时,要综合考虑抗性突变频率、突变体的适合度和病害的发生特点,并结合活体研究才能给出比较合理的结论^[13]。

啉霉胺是最新的灰霉病防治药剂,在以后相当长的一段时间内可能是当家药剂^[2,3]。本研究表明啉霉胺虽然只应用了几年的时间,但已经产生了抗性,这与已有报道一致^[7-9,12]。已知灰霉病菌对啉霉胺的抗性是由单个质量基因控制的^[5]。应格外注意其使用的科学合理性,以避免抗性群体的快速发展。

另外,作者首次检测到了灰霉病菌对百菌清的低水平抗性,说明多位点的非专化性杀菌剂也会出现抗性,只是发展较慢而已。其抗性机制还有待进一步研究。

致谢:南京农业大学周明国教授、浙江大学李红叶教授、沈阳农业大学祁之秋博士提供部分菌株,特此致谢!

参考文献:

- [1] DONG Jin-gao (董金皋). Agricultural Plant Pathology North Edition (农业植物病理学) (北方本) [M]. Beijing (北京): Chinese Agriculture Press (中国农业出版社), 2001: 183-185.
- [2] Rosslenbroich H J, Stuebler D. Botrytis cinerea—history of chemical control and novel fungicides for its management [J]. Crop Protection, 2000, 19: 557-561.
- [3] JIA Xiao-hua (贾晓华). Sensitivity Baselines of Botrytis cinerea and Sclerotinia sclerotiorum to Pyrimethanil and Resistance of Botrytis cinerea (番茄灰霉病菌和油菜菌核病菌对啉霉胺的敏感性基线及番茄灰霉病菌抗药性研究) [D]. Nanjing (南京): Nanjing Agricultural University (南京农业大学), 2004.
- [4] Elad Y, Shabi E, Katan T. Negative cross-resistance between benzimidazole and N-phenyl carbamate fungicides and control of Botrytis cinerea on grapes [J]. Plant Pathology, 1988, 37: 141-147.
- [5] Hilber U W, Hilber B M. Genetic basis and monitoring of resistance of Botrytis cinerea to anilopyrimidines [J]. Plant Disease, 1998, 82: 496-500.
- [6] Belen G J, Scholten G. Acquired resistance to benomyl and some other systemic fungicides in a strain of Botrytis cinerea in cyclamen [J]. Netherland Journal of Plant Pathology, 1971, 77: 83-90.
- [7] Latorre B A, Spadaro I, Rioja M E. Occurrence of resistant strains of Botrytis cinerea to anilopyrimidine fungicides in table grapes in Chile [J]. Crop Protection, 2002, 21 (10): 957-961.
- [8] Pappas A C. Evolution of fungicide resistance in Botrytis cinerea in protected crops in Greece [J]. Crop Protection, 1997, 16 (3): 257-263.
- [9] Baroffio C A, Siegfried W, Hilber U W. Long-term monitoring for resistance of Botrytis cinerea to anilopyrimidine, phenylpyrazole and hydroxylanilide fungicide in Switzerland [J]. Plant Dis, 2003, 87: 662-666.
- [10] ZHOU Ming-guo (周明国), YE Zhong-yin (叶钟音). 植物病原菌对苯并咪唑类及相关杀菌剂的抗药性 [J]. Plant Protection (植物保护), 1987, 18 (2): 31-33.
- [11] DING Zhong (丁中), LU 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), 2002, 3 (4): 59-63.
- [12] JI Ming-shan (纪明山), QI Zhi-qiu (祁之秋), ZHAO Ping (赵平), et al. 番茄灰霉病对啉霉胺抗药性的试验 [J]. J Shenyang Agric Univ (沈阳农业大学学报), 2002, 33 (5): 345-347.
- [13] Brent K J, Hollom D W. Fungicide Resistance: The Assessment of Risk [M]. Brussels: GCPE, 1998.

(Ed. JIN SH)