

• 研究论文 •

黄瓜白粉病菌对己唑醇抗性诱导及抗性菌株生物学性状的研究

杨连来, 慕卫*, 刘峰, 陈召亮, 翟茹环

(山东农业大学 植物保护学院, 山东 泰安 271018)

摘要:室内通过紫外线照射和药剂驯化相结合的方法连续诱变 7 代, 获得了黄瓜白粉病菌 *Sphaerotheca fuliginea* 对己唑醇的抗性菌株, 该抗性菌株对己唑醇的抗性水平达到 105 倍, 其产孢量和致病力比敏感菌株略高, 但差异不显著, 且对戊唑醇、腈菌唑、多抗霉素和啞菌酯无交互抗性, 对醚菌酯表现交互抗性, 结果表明田间用己唑醇防治黄瓜白粉病可能存在抗性风险。

关键词:黄瓜白粉病菌; 诱导; 抗药性; 己唑醇; 生物学性状

中图分类号: S481.4 S436.421.1

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2007)01-0029-05

Induction of Resistance to Hexaconazole and Biological Properties of Hexaconazole-resistant Strains of *Sphaerotheca fuliginea*

YANG Lian-lai MU Wei*, LIU Feng CHEN Zhao-liang ZHAIRu-huan

(College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018 Shandong Province, China)

Abstract Hexaconazole-resistant strains of *Sphaerotheca fuliginea* were obtained by chemical mutagenesis and UV irradiation in the laboratory. The resistance factor of the resistant strain was 105 fold, while the sporulation capacity and pathogenicity were higher than their parent strains without significant difference. Hexaconazole-resistant strains exhibited no cross-resistance to tebuconazole, myclobutanil, polyoxin and azoxystrobin, but showed positive resistance to kresoxim-methyl. The results suggested that *S. fuliginea* may develop resistance to hexaconazole when it was used to control cucumber powdery mildew in the field.

Key words *Sphaerotheca fuliginea*; induction; resistance; hexaconazole; biological properties

黄瓜白粉病是黄瓜生产上的重要病害, 在全国各地都有发生。该病在作物全生育期均可受害, 病菌侵染黄瓜后, 在黄瓜叶片表面密布白色粉状物, 导致其光合作用下降, 阻碍植株正常的生长发育, 最终导致黄瓜产量降低^[1]。三唑类杀菌剂是目前防治该类病害的高效药剂, 其中又以己唑醇防效最为突出^[2], 该药剂于 2004 年在我国登记

用于防治黄瓜白粉病, 具有用量少、对植株相对安全性高的特点, 应用潜力较大。但由于三唑类杀菌剂具有共同的作用位点, 长期、单一使用易使病原菌产生抗药性。1981 年英国 Fletcher 等^[3]首次报道了大麦白粉病菌对三唑醇的灵敏度下降。Huggenbeger 等^[4]报道了药剂对瓜类白粉病菌出现了药效下降的现象。有研究表明, 三唑类杀菌

收稿日期: 2006-09-07; 修回日期: 2006-11-17.

作者简介: 杨连来 (1980-), 男, 硕士研究生; * 通讯作者: 慕卫 (1971-), 女, 副教授, 研究方向为农药毒理与应用技术. 联系电话: 0538-8242611; E-mail: mww.e@sdau.edu.cn

©1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

剂存在着抗药性风险和同类结构群体中的交互抗性^[5]。目前尚无瓜类白粉病菌对己唑醇产生抗药性的报道,在该药剂广泛应用前有必要明确黄瓜白粉病菌对其产生抗性的风险。笔者在室内获得己唑醇抗性菌株的基础上,对抗性与敏感菌株生物学特性进行了比较研究,旨在为评估黄瓜白粉病菌对己唑醇产生抗性的风险及科学使用该药剂提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试药剂 95%己唑醇(hexaconazole)原药及95%戊唑醇(tebuconazole)原药(江苏常州市丰登农药厂);95%腈菌唑(myclobutanil)原药(浙江一帆农化有限公司);有效成分质量分数为0.3%的多抗霉素(polyoxin)水剂(郑州中兴化工有限公司);90%醚菌酯(kresoxim-methyl)PC(山东京博农化有限公司);25%啞菌酯(azoxystrobin)SC(先正达中国投资有限公司)。将己唑醇、戊唑醇和腈菌唑原药用环己酮和二甲基甲酰胺溶解后,加乳化剂EH10和1602[‡],配制有效成分质量分数为5%的微乳剂,喷施时直接用水稀释至其使用浓度。

1.1.2 供试菌种 黄瓜白粉病菌 *Sphaerotheca fuliginea*, 采自山东泰安未施过药剂的泰山山脉的葫芦植株。选择粉霉堆少的叶片,剪取与其他病斑分离较远的单个粉霉堆,用湿润毛笔刷沾取单孢子堆,刷到健康黄瓜子叶上,罩以白色塑料杯隔离并于20℃、光照16 h/d培养箱中培养。

1.1.3 供试黄瓜品种 研4号。育苗基质由山东农业大学园艺学院提供。

1.2 黄瓜白粉病菌对己唑醇敏感性的测定

按照文献[2]方法进行。

1.3 黄瓜白粉病抗药性菌株的获得方法

1.3.1 紫外诱变 将野外采集的敏感菌株配制成孢子悬浮液,浓度为每mL中含 1×10^5 个分生孢子,采用涂抹法接种在黄瓜子叶上培养。将充分产孢的黄瓜植株于30 W的紫外灯(波长254 nm)下分别照射(预热30 min,距离黄瓜子叶30 cm)2、3、4、5、10 min后,放置在培养箱内,于20℃黑暗条件下培养24 h,转移到20℃、光照16 h/d的培养箱内培养至产生大量的粉霉堆,用毛笔扫下,配成孢子悬浮液再次接种,3 d后用小

型喷雾器均匀喷施系列浓度的己唑醇水稀释液,晾干后继续在培养箱内培养6 d有明显可见病斑后检查并记录子叶病斑数目。根据贾忠明介绍的检查病斑个数和药剂对病害抑制率的计算方法^[2]求其 EC_{50} 值。以照射后 EC_{50} 与照射前 EC_{50} 的比值计为抗性水平,用抗性水平最高的照射时间连续诱变7代,记录第1、3、5、7代的抗性水平。

1.3.2 药剂驯化 将敏感菌株孢子悬浮液接种于黄瓜子叶上,在培养箱内20℃、光照16 h/d培养3 d后用小型喷雾器均匀喷施系列浓度的己唑醇水稀释液,晾干后继续在培养箱内培养6 d检查并记录子叶病斑数目,计算其 EC_{50} 值^[6]。将发病的粉霉堆用毛笔扫下,配成孢子悬浮液再次接种黄瓜子叶,培养3 d后喷施己唑醇水稀释液(浓度为前次的 EC_{50} 浓度),作为药剂筛选的第1代,如此连续测其7代后,记录第1、3、5、7代的抗性水平。

1.3.3 先紫外诱变后药剂驯化 按照1.3.1节所确定的紫外线照射时间照射黄瓜白粉病菌菌株,先在20℃黑暗培养箱内培养24 h后转移到20℃、光照16 h/d的培养箱内培养至产生大量的粉霉堆,用毛笔扫下,配成孢子悬浮液接种在黄瓜子叶上,按1.3.2节方法确定的 EC_{50} 浓度喷施己唑醇处理作为第1代,再将上述喷施己唑醇药液后仍发病的黄瓜白粉病菌粉霉堆扫下,接种后再用紫外线照射相同的时间,如此反复进行紫外诱导和药剂驯化7代,记录第1、3、5、7代的抗性水平。

1.3 抗性稳定性的测定

将上述3种方法中获得的抗性水平最高的菌株在无药情况下培养4代,喷施系列浓度的己唑醇,计算每代的 EC_{50} 值,并比较抗性水平的变化。

1.4 抗性菌株的生物学性状研究

1.4.1 敏感菌株和抗性菌株孢子萌发 将敏感菌株和抗性菌株的孢子悬浮液分别用涂抹法接种于黄瓜子叶,在培养箱内20℃、光照16 h/d培养7 d打取叶圆片后按照Kuziyal^[7]所描述的方法按(1)式计算孢子萌发率。每12 h检查一次结果,试验重复3次。

$$\text{孢子萌发率}(\%) = \frac{\text{萌发的孢子个数}}{\text{总的孢子个数}} \times 100 \quad (1)$$

1.4.2 敏感菌株和抗性菌株致病力和产孢量的测定 分别将敏感菌株和抗性菌株孢子悬浮液浓度调至每mL含 3.5×10^5 个分生孢子,采用涂抹

法接种在黄瓜植株子叶上, 置于培养箱内 20℃、16 h/d 光照培养, 8 d 后根据 (2) 式调查病情指数, 重复 2 次。

分级标准^[8]: 0 级, 无病斑; 1 级, 1~3 个病斑; 2 级, 4~6 个病斑; 3 级, 7~9 个病斑; 4 级, 10~11 个病斑; 5 级, > 11 个病斑。

$$\text{病情指数} = \frac{\sum (\text{病叶数} \times \text{相对级数}) \times 100}{(\text{调查总叶数} \times \text{总级数})} \quad (2)$$

将发病的黄瓜白粉病菌用毛笔蘸水洗刷下来, 经振荡使孢子分散悬浮, 用纽鲍尔血球计数板记录孢子数。

1.4.3 抗性菌株交互抗性的测定 用子叶涂抹法将所获得的抗己唑醇菌株孢子接种至黄瓜子叶上, 96 h 后分别喷施系列浓度的戊唑醇、腈菌唑、多抗霉素、嘧菌酯、醚菌酯等药液, 测其 EC_{50} 值。根据抗性菌株 EC_{50} 与敏感菌株 EC_{50} 的比值, 确定抗药性水平。

2 结果与分析

2.1 黄瓜白粉病菌对己唑醇的敏感性测定

通过多次子叶涂抹法对黄瓜白粉病菌进行室内毒力测定, 结果表明该方法重复性好, 且较稳定。以多次测定的平均值确定黄瓜白粉病菌对己唑醇的敏感基线 (EC_{50}) 为 0.028 15 g/mL。根据 FAO 的抗性程度划分标准^[9], 确定低抗菌株 EC_{50} 值为 0.140 8~0.281 5 g/mL, 中抗菌株 EC_{50} 值为 0.281 5~1.126 0 g/mL, 高抗菌株 EC_{50} > 1.126 0 g/mL。

2.2 黄瓜白粉病菌对己唑醇抗药性菌株的获得方法的比较

2.2.1 紫外线照射时间对菌株抗药性诱变效率的影响 由图 1 可以看出, 通过紫外线照射黄瓜白粉病菌不同时间, 获得了白粉病菌的抗性菌株, 其中以照射 3 min 时所获得的抗性水平最低, 为 5.8 倍, 而以照射 5.5 min 时所获得的抗性水平最高, 为 13.66 倍。因此, 确定紫外线最佳照射时间为 5.5 min。

2.2.2 三种获得抗性菌株方法的比较 由图 2 可以看出, 3 种方法都可以得到黄瓜白粉病菌对己唑醇的高抗菌株。紫外诱导和药剂驯化 7 代获得的抗性水平比紫外诱导 7 代和药剂驯化 7 代获得的抗性水平都高, 且 3 种方法在 F3 到 F5 代之间

有一个较快的增长, 其中以紫外诱导和药剂驯化相结合得到的抗性菌株的抗性水平最高, 为 105 倍。

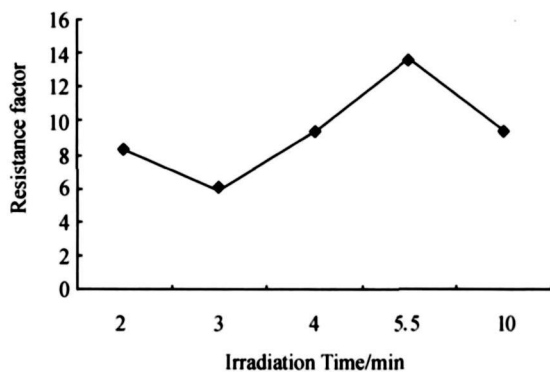


Fig 1 Resistance factor of *S. fuliginea* under ultraviolet irradiation for different period of time

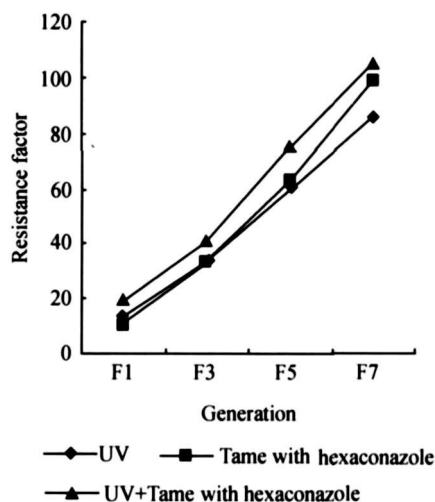


Fig 2 Comparison of the resistance factor of *S. fuliginea* developed by different methods

从图 3 可以看出, 紫外诱导和药剂驯化相结合获得的抗性菌株无药培养 4 代 (F8, F9, F10, F11) 后, 抗性水平随着转接次数的增加而略有降低, 但仍表现出较高的抗药性, 说明抗性菌株的稳定性较好。

2.3 抗性菌株的生物学性状

2.3.1 敏感菌株和抗性菌株的孢子萌发 敏感菌株分生孢子萌发较抗性菌株分生孢子萌发早, 但其菌丝体产孢的时间要比抗性菌株的晚 5 h。敏感菌株和抗性菌株的分生孢子都在接种 40 h 后开始萌发, 且两者萌发率都相当低, 一般为 10%~20%。虽然萌发率低, 但菌株的产孢能力却非常强, 接种后 6 d 新生长的菌丝体上已经开始产孢,

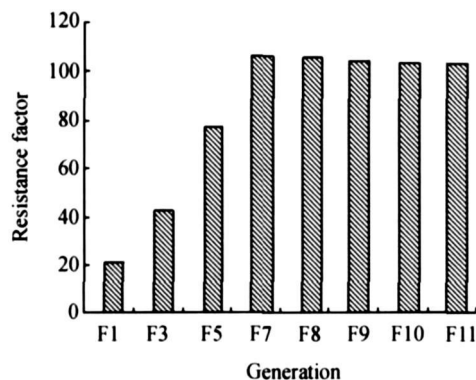


Fig 3 Resistance factor of different generation of *S. fuliginea* under the combination action of UV light and hexaconazole

8 d后,可以观察到大量成串的分生孢子,接种 9 d 后,可观察到白粉病病斑。

Table 1 Cross-resistance of hexaconazole-resistant *S. fuliginea* to five fungicides

Fungicides	Susceptible strain EC ₅₀ /(g/mL)	Resistant strain EC ₅₀ /(g/mL)	Resistance factor
			R/S(95% Confidence interval)
Tebuconazole	0.4575 Bb	0.4764 Bb	1.04 Bb(0.67~1.32)
Myclobutanil	0.2493 Bb	0.3308 Bb	1.33 Bb(0.59~1.88)
Polyoxin	9.0820 Aa	9.9059 Aa	1.09 Bb(0.31~2.63)
Kresoxim-methyl	0.008359 Cc	0.0489 Cc	5.85 Aa(0.10~405.88)
Azoxystrobin	0.1048 Bb	0.1211 Bb	1.16 Bb(1.11~1.23)

Note: Data followed by different uppercase and lowercase letters indicate significant difference at 1% and 5% levels respectively.

3 讨论

黄瓜白粉病是保护地黄瓜种植中发生和为害较重的病害之一,由于用药频繁,致使病原菌对药剂产生了不同程度的抗性,防效大幅度降低。因此对白粉病菌进行抗药性监测和筛选更高效药剂是一项长期工作。但由于黄瓜白粉病菌无法离体培养,测定该病菌对药剂的敏感性比较困难。已报道的抗性检测方法中,郝永娟等使用了毛笔蘸取孢子悬浮液接种黄瓜真叶的方法^[8],李兴红等采用子叶喷雾接菌法^[6],存在试验周期长或接菌不均匀的缺点。而本研究采用改进的子叶涂抹法使之更加简便。

在缪晓鹏等^[10]的研究中,野生黄瓜白粉病菌分生孢子一般接种 4 h后就开始萌发,24 h后萌发率达到 80%,接种后 7~8 d出现病斑。本项研究中,敏感菌株和抗性菌株分生孢子接种后开始萌发的时间都在 40 h以上,出现病斑的时间仍为 7~8 d,其原因可能是由于菌株产孢能力强,能够在萌发后短时间内产孢,所以其繁殖速度也较快。

2.3.2 敏感菌株和抗性菌株致病力和产孢量的比较 在涂抹相同孢子量的情况下,发病 10 d后抗性菌株产孢量为 1.51×10^5 个/mL,而敏感菌株的产孢量为 1.18×10^5 个/mL,表明抗性菌株的产孢量高于敏感菌株,但二者差异不显著 ($P = 0.053 > 0.05$)。从病情指数来看,抗性菌株的为 30,而敏感菌株的为 25,表明抗性菌株的致病力略强于敏感菌株,但二者并无显著差异 ($P = 0.2778 > 0.05$)。

2.3.3 抗性菌株对不同杀菌剂的交互抗性 从表 1可以看出,室内获得的对己唑醇高抗的黄瓜白粉病菌抗性菌株对戊唑醇、腈菌唑、多抗霉素和啮菌酯的抗性水平都在 1 左右,表明室内获得的抗性菌株对戊唑醇、腈菌唑、多抗霉素和啮菌酯都未表现出交互抗性,而与醚菌酯的抗性水平为 5.85,表现出交互抗性。

目前国内外对于禾谷类白粉病菌 *Erysiphe graminis* 的抗药性研究较多,结果表明,由于病菌具有潜育期短、再侵染频繁、流行速率高的特点,其病原群体具有很高的潜在适应力,对杀菌剂容易产生抗性^[11],表现出对三唑类杀菌剂的敏感性大幅度降低^[12]。另据 Collins等^[13]研究,在禾谷类白粉病菌上,三唑类杀菌剂品种之间存在交互抗性,而在本研究中,黄瓜白粉病菌抗己唑醇菌株对同为三唑类杀菌剂的戊唑醇、腈菌唑没有表现出交互抗性,其原因有待于进一步明确。

本文报道的仅是在室内研究的结果,在田间环境下,由于黄瓜白粉病菌的传播方式属气传,且能够因大量产孢和用药频繁而易导致菌株发生变异,变异的菌株能够在更广的范围内进行传播。本研究表明,田间用己唑醇防治黄瓜白粉病可能存在着黄瓜白粉病菌对其产生抗性的风险。

参考文献:

[1] ZHOU Yilin(周益林), DUAN Xia-yu(段霞瑜), SHENG

- Bao-qin(盛宝钦). 植物白粉病的化学防治进展 [J]. Chin J Pestic Sci(农药学报), 2001, 3(2): 12-18.
- [2] JIA Zhong-ming(贾忠明), LIU Feng(刘峰), MU Wei(慕卫), et al 黄瓜白粉病菌接种及对杀菌剂敏感性测定方法 [J]. Acta Phytophylacica Sinica (植物保护学报). 2006, 33(1), 99-103.
- [3] FLETCHER J WOLFE M. Insensitivity of *Erysiphe graminis f. sp. hordei* to Triadimenol Triadimenol and other Fungicides [C] //Proc Br Crop Prot Conf, 1981, 2: 633-640.
- [4] HUGGENBEGER F, COLLINS M A, SKYLAKAKIS G, et al Decreased Sensitivity of *Sphaerotheca Fuliginea* to fenarimol and other Ergosterol Biosynthesis Inhibitor [J]. Crop Prot, 1984, (3): 137-149.
- [5] KENDALL S J Cross-resistance of Triadimenol-resistant Fungal Isolates to other Sterol C-14 Demethylation Inhibitor Fungicides [C] //Proc British Crop Prot Con—Pests and Diseases, 1986: 539-547.
- [6] LIX ing-hong(李兴红), YAN Hong(严红), ZHANG Tao-tao(张涛涛). 瓜类白粉病菌对新型杀菌剂室内抗性诱导研究 [C] //ZHOU Ming-guo(周明国). The Research of Chemical Control on Plant Disease in China(中国植物病害化学防治研究), Beijing(北京): China Agricultural Science and Technology Press(中国农业科技出版社), 2002: 312-314.
- [7] KUZUYAL M, HOSoya K, YASHIROL K, et al Powdery Mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) Resistance Immediates Selectable at the Haplotype Level [J]. J Experimental Botany, 2003, 54: 1069-1074.
- [8] HAO Yong-jian(郝永娟), WANG Wan-li(王万立), LIU Chun-yan(刘春艳), et al 黄瓜白粉病生测技术的改进 [J]. Tianjin Agric Sci(天津农业科学), 2005, 11(3): 37-40.
- [9] GEORGOPOULOS S G, DEKKER J Detection and Measurement of 30 Fungicide Resistance [J]. FAO Plant Protection Bulletin, 1982, (2).
- [10] MU Xiao-peng(缪晓鹏), NI Chang-chun(倪长春). 新化合物 H-11 对黄瓜白粉病菌作用特性初探 [J]. Zhejiang Chemical Industry(浙江化工), 2000, (31): 64-65.
- [11] SVEC M, MIKLOV KOVA M, SKYORA M, et al Fungicide Sensitivity of Populations of Wheat Powdery Mildew (*Erysiphe graminis f. sp. tritici*) in Central Europe in 1993 [J]. Pest Sci, 1995, 43: 47-52.
- [12] GIESU, RMBACH E, Binder H, et al Biological Profile of SAN619F and Related EBI-fungicides [C] //Proc British Crop Prot Con—Pests and Diseases, 1986: 857-864.
- [13] COLLINS P, BROWN JK M. Resistance and Cross Resistance of *Erysiphe graminis* to Triazole and Morpholine Fungicides [C] //The First International Powdery Mildew Conference, Avignon, France 1999: 41.

(Ed. JIN SH)

会 ☆ 议 ☆ 信 ☆ 息

为加强农药创制人员之间的交流, 开拓创新思路 and 理念, 促进我国新农药的研究开发工作, 提高我国新农药创制的整体水平, 中化化工科学技术研究总院拟于 2007 年 5 月中旬在杭州召开“第七届全国新农药创制学术交流会”。

会议将主要围绕以下几个议题进行研讨: 靶标及作用机制(机理)研究; 新化合物的合成研究; 天然产物的分离、提取研究; 生物测定方法研究; 安全性评价方法研究; 新助剂及加工技术研究; 行业共性技术研究等。

有关会议的相关事宜可与中化化工科学技术研究总院黄文耀先生联系 (E-mail: cnprc@263.net 电话: 010-64262348)。