

◆ 药效与应用 ◆

番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)对3种杀菌剂的抗性监测及交互抗药性研究

魏佳爽,袁善奎*,向冰峰,朱志峰

(农业农村部农药检定所 北京 100125)

摘要:采用菌丝生长速率法,测定了采自江苏和河南的158株番茄灰霉病菌对啉菌酯、啶酰菌胺、啶菌噁唑等3种药剂的敏感性,并研究了部分抗性菌株的交互抗性情况。结果显示,供试菌株对啉菌酯、啶酰菌胺、啶菌噁唑的 EC_{50} 值分别在0.004 5~90.5、0.057 6~36.8、0.016 9~2.64 $\mu\text{g}/\text{mL}$,并分别出现了19.0%、11.4%、0.6%的抗性菌株频率。整体上,江苏菌株的抗性水平高于河南地区。番茄灰霉病菌对啉菌酯、啶菌噁唑、腈菌酯和吡唑醚菌酯之间存在交互抗性;对啶酰菌胺与萎锈灵和噁唑醚菌酯之间存在交互抗性;但与氟吡菌酰胺、之间不存在交互抗性。病原菌群体中已存在多药抗性,1株病原菌对啉菌酯、啶酰菌胺、啶菌噁唑等3种药剂同时产生可抗性,17株病菌对啉菌酯和啶酰菌胺同时产生了抗性。

关键词:番茄灰霉病菌;啉菌酯;啶酰菌胺;啶菌噁唑;交互抗性

中图分类号:S 436.412.1+3 文献标志码:A doi:10.3969/j.issn.1671-5284.2021.01.010

Resistance Monitoring and Cross-resistance Study of *Botrytis cinerea* to Three Fungicides

WEI Jiashuang, YUAN Shankui*, XIANG Bingfeng, ZHU Zhifeng

(Institute of the Control of Agrochemicals, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100125, China)

Abstract: The sensitivity of 158 *Botrytis cinerea* strains, which were collected from Jiangsu and Henan to azoxystrobin, boscalid and SYP-Z048 were determined by mycelial growth method, as well as the cross resistance of some resistant strains were also studied. The results showed that the EC_{50} values of the tested strains to azoxystrobin, boscalid and were 0.004 5-90.5, 0.057 6-36.8 and 0.016 9-2.64 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. There were 19.0%, 11.4% and 0.6% frequency of resistant strains, respectively. As a whole, the resistance level of Jiangsu strains was higher than that of Henan regions. *Botrytis cinerea* has cross-resistance to azoxystrobin, kresoxim-methyl, trifloxystrobin and pyraclostrobin, and cross-resistance to boscalid, carboxin and thifluzamide, but no cross-resistance to flupyramide. The problem of multi-drug resistance already exists in the pathogen population. One pathogen has resistance to azoxystrobin, boscalid and SYP-Z048 simultaneously, while 17 isolates have resistance to azoxystrobin and boscalid simultaneously.

Key words: *Botrytis cinerea*; azoxystrobin; boscalid; SYP-Z048; cross resistance

番茄灰霉病是一种世界性的真菌病害,主要由灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)侵染引起。该病害在国内外早有报道,已成为设施农业上一种重要病害,发生严重时可减产40%~50%,甚至绝产,给农业生产带来巨大损失,是番茄生产中最具毁灭性的

病害之一^[1]。灰葡萄孢菌的寄主范围广,可导致500多种植物病害,其中农作物超过200种^[2]。目前化学防治仍是控制该病害的主要手段。由于灰葡萄孢具有繁殖力强、变异速度快等特点,被杀菌剂抗性行动委员会(FRAC)归入高抗性风险病原菌^[3]。在山西、

收稿日期:2020-04-20

基金项目:国家自然科学基金(31572031)

作者简介:魏佳爽(1999—),女,河北保定人,硕士研究生,主要研究方向为植物病理学。E-mail: wjjs1174@163.com

通信作者:袁善奎(1976—),男,湖北利川人,博士,研究员,主要从事杀菌剂抗性研究。E-mail: skyuan76@sina.com

上海等地区已发现其对多菌灵、腐霉利、啞霉胺、氟吡菌酰胺、啞菌酯、啞酰菌胺等多种杀菌剂产生了不同程度抗性^[4-7]。

随着生产上番茄灰霉病菌对多菌灵、乙霉威等一些传统药剂不断产生抗性,啞菌酯、啞酰菌胺、啞菌咪唑等药剂已成为生产上防治该病的主要药剂品种。本研究采用菌丝生长速率法,分别测定了采自河南省和江苏省8个不同地市番茄种植区的158株番茄灰霉病菌对上述3种药剂的敏感性,分析了不同地区菌株的敏感性差异及交互抗性情况,以期对番茄灰霉病的科学合理用药提供参考。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株

2019年,从江苏淮安、江苏东台、江苏泰州、河南洛阳、河南许昌、河南开封、河南郑州、河南新乡等8地的番茄种植基地随机采集已感染灰霉病的病果共220个,参考文献方法^[8-9]对灰霉病菌进行分离、鉴定和保存,共分离得到158个担孢菌株。所有菌株均在4℃下保存于PDA斜面中待用。

1.1.2 供试药剂

97%啞菌酯原药、97%啞酰菌胺原药、90.2%啞菌咪唑原药、97%醚菌酯原药、97%肟菌酯原药、96%吡唑醚菌酯原药、98%萎锈灵原药、96%氟吡菌酰胺原药、96%噻呋酰胺原药,海利尔药业集团股份有限公司,99%水杨羟肟酸(SHAW),美国Sigma-Aldrich公司。以上各类原药被丙酮溶解配制成 1.0×10^4 mg/L母液,99%水杨羟肟酸(SHAW)被二甲基亚砷溶解配制成 1.0×10^4 mg/L母液,分别置于4℃冰箱中保存备用。

1.1.3 供试培养基

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA),北京奥博星生物技术有限公司。其用于菌株培养及菌丝生长抑制试验。

1.2 试验方法

1.2.1 番茄灰霉病菌对啞菌酯、啞酰菌胺、啞菌咪唑的敏感性测定

笔者采用菌丝生长速率法^[10]。各菌株先在PDA平板上预培养5 d,然后制取直径6 mm的菌饼,菌丝朝下分别接入含系列浓度啞菌酯(同时含100 μg/mL SHAM)、啞酰菌胺、啞菌咪唑的PDA平板上。每皿接种1个菌饼,每处理重复3次,以不含药剂的PDA平板为对照。25℃下培养5 d后采用十字交叉法测量菌落

直径。

1.2.2 番茄灰霉病菌抗药菌株对不同杀菌剂间的交互抗性测定

首先,根据158株病原菌对啞菌酯、啞酰菌胺和啞菌咪唑的敏感性分部情况,分析番茄灰霉病菌对上述3个杀菌剂的交互抗性情况。

其次,从供试菌株中选择5株对啞菌酯敏感性不同的菌株,采用1.2.1所述的菌丝生长速率法分别测定其对其他甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂如醚菌酯、肟菌酯和吡唑醚菌酯的敏感性;另从供试菌株中选择5株对啞酰菌胺敏感性不同的菌株,分别测定其与其他琥珀酸脱氢酶抑制剂(SDHI)类杀菌剂如萎锈灵、氟吡菌酰胺、噻呋酰胺的敏感性。

1.3 数据处理

采用SPSS 22.0统计软件对数据进行处理与分析,采用该软件描述统计模块进行Shapiro-Wilk法(W法)正态性检验, $P > 0.05$ 则符合正态分布,反之则为非正态分布,通过probit模块计算药剂抑制病原菌菌丝生长的毒力回归方程($y = A + Bx$)、相关系数和 EC_{50} 值。

2 结果与分析

2.1 田间番茄灰霉病菌对3种杀菌剂的敏感性及其抗性

敏感性测定结果表明,158个番茄灰霉病菌菌株对啞菌酯的 EC_{50} 值在0.004 5~90.5 μg/mL,平均 EC_{50} 值为 9.80 ± 21.1 μg/mL,最高值为最低值的 2.0×10^5 倍;对啞酰菌胺的 EC_{50} 值在0.057 6~36.8 μg/mL,平均 EC_{50} 值为 2.56 ± 6.35 μg/mL,最高值为最低值的639倍;对啞菌咪唑的 EC_{50} 值在0.016 9~2.64 μg/mL,平均值为 0.13 ± 0.23 μg/mL,最高值为最低值的156倍。在供试的3种杀菌剂中,对于敏感菌株而言,均具有较高活性,其中啞菌酯对番茄灰霉病菌的活性最高,其次是啞酰菌胺和啞菌咪唑,但从整个群体的平均敏感性水平来看,番茄灰霉病菌群体对啞菌咪唑最敏感,其次是啞酰菌胺,最后是啞菌酯,说明病原菌对啞菌酯出现了较高水平的抗性。158株番茄灰霉病菌对啞菌酯、啞酰菌胺、啞菌咪唑的抗性频率分别为19.0%、11.4%、0.6%。

将上述3个药剂对158株番茄灰霉病菌的 EC_{50} 值范围划分为7个区间,每个区间的菌株出现频率见图1。通过SPSS分析Shapiro-Wilk正态性检验结果,显示菌株对啞菌酯($W=0.905$, $P < 0.05$)、对啞酰菌胺($W=0.815$, $P < 0.05$)、对啞菌咪唑($W=0.946$, $P <$

0.05)的敏感性频次分布均不符合正态分布,表明不同番茄灰霉病菌对啞菌酯、啞酰菌胺、啞菌噁唑的敏感性均出现了分化,并已出现敏感性降低的亚群体或抗性菌株。

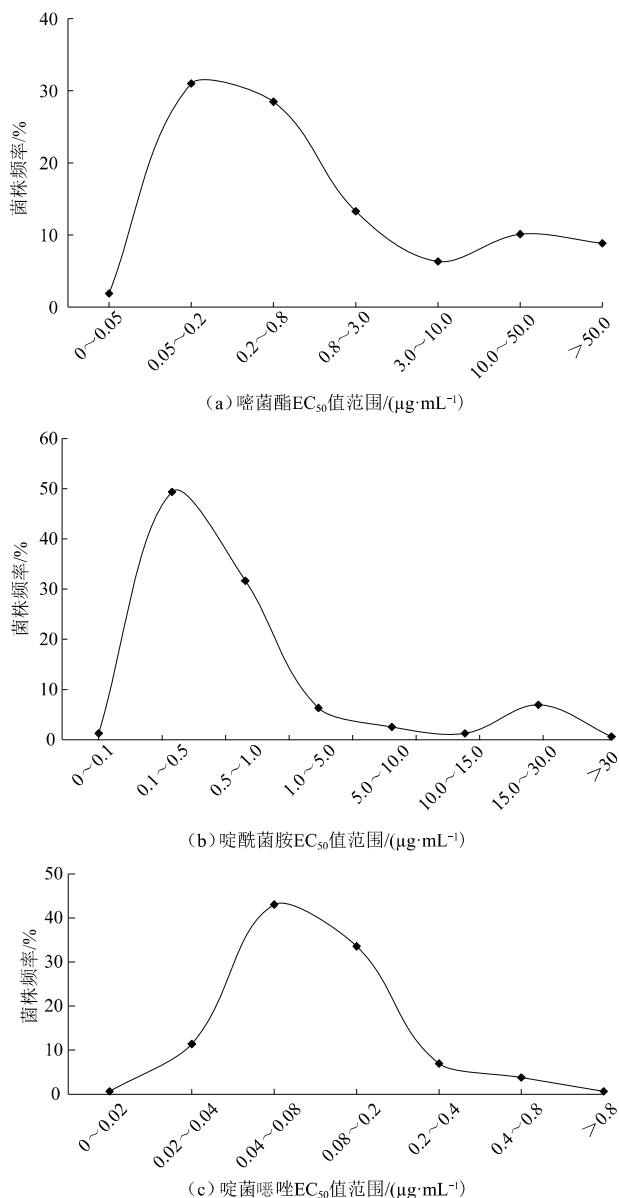


图 1 158 株番茄灰霉病菌对 3 种杀菌剂的敏感性频次分布

2019年从江苏省和河南省分别采集97株和61株番茄灰霉病菌株,2个地区的菌株对啞菌酯和啞酰菌胺的敏感性差异较大,但对啞菌噁唑的平均敏感性接近(表1)。总体来说,江苏地区的番茄灰霉病菌对啞菌酯和啞酰菌胺出现了较严重的抗性,抗性菌株频率分别为25.8%、18.6%,并且检测到1株抗啞菌噁唑的抗性菌株;河南地区采集的番茄灰霉病菌中未检测到对啞酰菌胺和啞菌噁唑的抗性菌株,仅检测到5株抗啞菌酯的抗性菌株,抗性频率为

8.2%。以上结果说明,在防治番茄灰霉病方面,江苏的用药水平要高于河南地区。

表 1 江苏和河南番茄灰霉病菌对 3 种杀菌剂的敏感性及其抗性情况

药剂	地区	EC ₅₀ 值/(µg·mL ⁻¹)			菌株频率	
		最低	最高	平均±标准偏差	敏感性	抗性
啞菌酯	江苏	0.060 4	90.5	13.54±24.57	72	25.8
	河南	0.004 5	56.4	3.84±12.08	56	5.0
啞酰菌胺	江苏	0.067 8	36.8	3.85±7.83	79	18.6
	河南	0.057 6	1.67	0.50±0.26	61	0
啞菌噁唑	江苏	0.016 9	2.64	0.13±0.28	96	1.0
	河南	0.020 2	0.64	0.11±0.10	61	0

2.2 番茄灰霉病菌对不同杀菌剂的交互抗性

2.2.1 番茄灰霉病菌对啞菌酯、啞酰菌胺和啞菌噁唑的交互抗性

从158株番茄灰霉病菌对啞菌酯、啞酰菌胺和啞菌噁唑的敏感性分布情况来看,只有1株菌株对啞菌噁唑出现了抗性,说明番茄灰霉病菌对啞菌噁唑与另外2个药剂之间不存在交互抗性;虽然对啞酰菌胺有抗性的17株病菌对啞菌酯也表现抗性,但从整体趋势来看,番茄灰霉病菌对啞菌酯和啞酰菌胺也不存在交互抗性。

2.2.2 番茄灰霉病菌对甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂的交互抗性

选择5株对啞菌酯敏感性不同的菌株,测定了其对于醚菌酯、肟菌酯和吡唑醚菌酯的敏感性。结果表明(表2),供试3种杀菌剂对5株番茄灰霉病菌菌丝生长的平均抑制活性依次为吡唑醚菌酯>肟菌酯>醚菌酯>啞菌酯,结果表明啞菌酯与醚菌酯、肟菌酯和吡唑醚菌酯均存在交互抗性。

表 2 番茄灰霉病菌对 4 种甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂的交互抗性

菌株	EC ₅₀ 值/(µg·mL ⁻¹)			
	啞菌酯	醚菌酯	肟菌酯	吡唑醚菌酯
Bc1	0.127	0.192	1.060	0.027
Bc5	0.137 0	0.010 2	0.099 6	0.031 9
Bc10	85.5	24.4	16.0	7.2
Bc18	3.90	1.39	16.80	0.31
Bc27	37.8	62.3	23.4	10.3

2.2.3 番茄灰霉病菌对SDHI类杀菌剂的交互抗性

选择5株对啞酰菌胺敏感性不同的菌株,测定了其对于萎锈灵、氟吡菌酰胺、噁唑酰菌胺的敏感性(表3)。结果表明,在SDHI类杀菌剂中,番茄灰霉病菌对啞酰菌胺最敏感,对另外3个药剂的敏感性较低,但

从整体趋势来看,啶酰菌胺与萎锈灵和噁唑啉酮均存在交互抗性,而与氟吡菌酰胺不存在交互抗性。

表3 番茄灰霉病菌对4种SDHI杀菌剂的交互抗性

菌株	EC ₅₀ 值/(μg·mL ⁻¹)			
	啶酰菌胺	萎锈灵	氟吡菌酰胺	噁唑啉酮
Bc1	0.35	6.42	51.60	8.90
Bc5	0.15	4.91	>100	34.60
Bc10	5.97	8.11	>100	55.00
Bc11	36.8	29.2	>100	>100
Bc27	24.8	35.8	>100	>100

2.3 番茄灰霉病菌对多药抗性情况

虽然番茄灰霉病菌对啉菌酯、啶菌噁唑和啶酰菌胺之间不存在交互抗性,但在研究过程中发现部分菌株存在多药抗性情况。对啶菌噁唑产生抗性的菌株HABc44同时对啉菌酯和啶酰菌胺产生了抗性,对啶酰菌胺产生抗性的18株病菌中有17株同时对啉菌酯产生了抗性,说明在生产上番茄灰霉病菌出现了较严重的多药抗性现象。

3 小结与讨论

通过试验,供试的158个番茄灰霉病菌株中,有128株对啉菌酯表现敏感,EC₅₀值在0.004 5~90.5 μg/mL,平均EC₅₀值为0.81 ± 1.27 μg/mL,这比Zhang等^[11]报道的敏感性基线(2.24 ± 1.29 μg/mL)更加敏感。另外30株表现抗性与敏感菌株的平均EC₅₀值相比,抗性倍数在14~112倍,呈低抗到高抗趋势;有140株对啶酰菌胺表现敏感,EC₅₀值在0.057 6~36.8 μg/mL,平均EC₅₀值为0.54 ± 0.36 μg/mL,与Zhang等^[12]报道的敏感性基线(1.07 ± 0.11 μg/mL)结果相比更加敏感。另外18株表现抗性与敏感菌株的平均EC₅₀值相比,抗性倍数在11~68倍,呈低抗到中等抗趋势;有157株对啶菌噁唑表现敏感,EC₅₀值在0.016 9~2.64 μg/mL,平均EC₅₀值为0.106 ± 0.095 μg/mL,与马建英等^[13]报到的敏感性基线(0.118 2 ± 0.036 3 μg/mL)结果一致。另外,从各药剂的敏感性分布曲线来看,灰霉病菌对啉菌酯的敏感群体的EC₅₀差异较大,变化幅度较宽。

本研究表明,番茄灰霉病菌对甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂存在交互抗性,这与武东霞等^[14]的研究结果一致,其发现灰葡萄孢菌对苯噻菌酯、啉菌酯、醚菌酯和吡唑醚菌酯之间存在正交互抗性,但与不同作用机制的杀菌剂无交互抗性。另外,研究发现番茄灰霉病菌对部分SDHI类杀菌剂存在交互抗性,但由于部分SDHI对灰葡萄孢菌的活性较低,从而未

表选处交互抗性情况。尽管本研究测定的大多数菌株对啉菌酯、啶酰菌胺、啶菌噁唑仍表现敏感,但抗药性菌株的出现表明采用这3种药剂防治番茄灰霉病具有一定的风险性,而且已发现大量菌株存在多药抗性现象,这将会导致一些混配药剂失去防效。此外,由于番茄灰霉病菌具有繁殖速度快、遗传变异大和适应性强等特点,极易对药剂产生抗药性,建议应加强番茄灰霉病对这几类药剂的敏感性监测,同时注意轮换或混合使用其他具有不同作用机制的药剂,以减小对田间种群的选择性压力,延缓病原菌对该类药剂的抗性发展。

参考文献

- [1] 刘福平, 黄台明, 宋淑芳, 等. 番茄灰霉病的生物学特性与防治研究进展[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(31): 10924-10926.
- [2] 肖景惠, 逢飞, 倪瑞琪, 等. 植物灰葡萄孢菌生物防治与化学防治机理的研究进展[J]. 中国蔬菜, 2019(9): 18-23.
- [3] FRAC. Pathogen Risk List [EB/OL]. (2019-09-01)[2021-01-14] <https://www.frac.info/docs/default-source/publications/pathogen-risk/frac-pathogen-list-2019>.
- [4] 赵建江, 路粉, 吴杰, 等. 河北省设施番茄灰霉病菌对啶酰菌胺和咯菌腈的敏感性[J]. 植物病理学报, 2018, 48(6): 817-821.
- [5] 冯宝珍, 李培谦. 山西运城温室番茄灰葡萄孢对啶酰菌胺的抗性[J]. 西北农业学报, 2019, 28(8): 1351-1357.
- [6] 纪明山, 刘妍, 朱赫, 等. 辽宁省番茄灰霉病菌对常用杀菌剂的抗性监测与交互抗性[J]. 农药, 2017, 56(9): 676-678.
- [7] 武文帅. 上海地区番茄灰霉病菌对几种重要杀菌剂的抗性检测[C]//中国植物病理学会. 中国植物病理学会2017年学术年会论文集. 泰安: 中国农业科学技术, 2017: 471.
- [8] 陈永萱, 陆家云, 许志刚. 植物病理学(第3版)[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995.
- [9] 陆家云. 植物病原真菌学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 332-448.
- [10] 中华人民共和国农业农村部. NY/T 1156.2-2006农药室内生物测定试验准则杀菌剂第2部分 抑制病原真菌菌丝生长试验平皿法[S]. 北京: 中国农业出版社, 2006.
- [11] ZHANG C Q, LIU Y H, DING L, et al. Shift of sensitivity of *Botrytis cinerea* to azoxystrobin in greenhouse vegetables before and after exposure to the fungicide[J]. Phytoparasitica, 2011: 293-302.
- [12] ZHANG Q, YUAN S K, SUN H Y, et al. Sensitivity of *Botrytis cinerea* from vegetable greenhouses to boscalid[J]. Plant Pathology, 2007, 56(4): 646-653.
- [13] 马建英, 马志强, 王红刚, 等. 灰葡萄孢菌对啶菌噁唑的敏感性基线及抗药突变体的诱导与生物学性状[J]. 农药学报, 2009, 11(1): 141-144.
- [14] 武东霞. 灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)对苯噻菌酯和咯菌腈的抗性风险研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2015.

(责任编辑:徐娟)