

黄瓜霜霉病菌烯肟菌酯敏感基线的建立及其室内抗药性风险评估

王岩 冯明鸣 朱书生 刘西莉

(中国农业大学 农学与生物技术学院, 北京 100094)

摘要 为研究黄瓜霜霉病菌对烯肟菌酯的敏感性及其室内抗药性风险,采用叶碟保湿法测定了 52 株黄瓜霜霉病菌对烯肟菌酯的敏感性。结果表明 52 个菌株的 EC_{50} (抑制中浓度) 差异较小,平均 EC_{50} 为 $(0.0101 \pm 0.0031) \mu\text{g}/\text{mL}$ 。黄瓜霜霉病菌对烯肟菌酯的敏感性频率分布呈连续单峰曲线,接近正态分布,没有出现敏感性下降的抗药性群体,这些病菌均为烯肟菌酯野生敏感菌株,因此可以采用其平均 EC_{50} 作为黄瓜霜霉病菌对烯肟菌酯的敏感基线。室内药剂驯化和紫外线诱变试验,获得了 10 株黄瓜霜霉病菌对烯肟菌酯不同抗性水平的突变体,其 EC_{50} 为 $1 \sim 5 \mu\text{g}/\text{mL}$,抗性指数为 80~500 倍,抗药性稳定,致病力、适合度、竞争力与亲本菌株相比没有明显差异,或优于亲本菌株。室内抗药性风险评估表明,黄瓜霜霉病菌对烯肟菌酯具有较高的抗药性风险,预示田间自然情况下抗药性菌株可能形成优势菌群而导致药剂防治失败的潜在风险。

关键词 黄瓜霜霉病菌; 烯肟菌酯; 敏感基线; 抗药性风险

中图分类号 S 481⁺.4; S 436.421.11

文章编号 1007-4333(2006)05-0025-05

文献标识码 A

Baseline-sensitivity and assessment of resistance risk of *Pseudoperonospora cubensis* to enostrobin

Wang Yan, Feng Mingming, Zhu Shusheng, Liu Xili

(College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract The baseline-sensitivity of the obligate parasite pathogen *Pseudoperonospora cubensis* to enostrobin was studied. Determined by detached leaves in vitro, the mean EC_{50} values was $(0.0101 \pm 0.0031) \mu\text{g}/\text{mL}$, and there was no resistant subpopulation among strains. Hence, this baseline sensitivity was suitable for field resistance monitoring. Ten highly enostrobin-resistant mutants were selected with resistance factors of 80 - 500 folds. The pathogenicity, fitness and competition of the enostrobin-resistant mutants were not significantly different from those of their parental strains. The level of resistance of enostrobin-resistant mutants was stable after 10 disease cycles on healthy leaves without enostrobin. Laboratory studies showed that resistance of *P. cubensis* to enostrobin was a high risk. Therefore, the epidemic development of the resistant population of *P. cubensis* would be possible in the field.

Key words *Pseudoperonospora cubensis*; enostrobin; baseline-sensitivity; resistance risk

甲氧丙烯酸酯类杀菌剂是 20 世纪 90 年代初开发的一类新型谱广杀菌剂,能有效地防治多种病原真菌和卵菌引起的病害,对环境和非靶标生物具有安全性,并且具有全新的作用机制,与目前使用的 DMIs、苯酰胺类、二甲酰亚胺类和苯并咪唑类杀

菌剂无交互抗性,从而引起了全世界的关注,并得到广泛应用,是继苯并咪唑类和三唑类杀菌剂后,具有广泛影响的新颖杀菌剂。自第一个商品化的甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂-阿米西达(腈嘧菌酯)问世,许多农药公司都相继开发出新的甲氧丙烯酸酯类杀菌剂。

收稿日期: 2006-02-09

基金项目: 国家科技支撑计划粮食丰产科技工程项目(2004BA520A15)

作者简介: 王岩,硕士研究生;刘西莉,副教授,通讯作者,主要从事杀菌剂药理学及病原菌抗药性研究, E-mail: seeding@cau.edu.cn

1996年在欧洲开始应用甲氧丙烯酸类杀菌剂苯氧菌酯防治小麦白粉病,然而,1998年在一些地区监测到抗药性个体,抗药性倍数大于500,所以目前认为这类杀菌剂具有较高的抗药性风险^[174]。本试验研究药剂烯炀菌酯(enostrobin),是由沈阳化工研究院1997年开发的国内第一个甲氧丙烯酸酯类杀菌剂,药剂杀菌谱广、活性高,对由鞭毛菌、接合菌、子囊菌、担子菌及半知菌引起的多种植物病害有良好的预防治疗效果,目前已申请了中国专利(CN1191670)和美国、日本及欧洲专利,2002年完成农药临时登记,登记靶标对象为黄瓜霜霉病菌^[577]。目前还未见有关黄瓜霜霉病菌对该药剂敏感性和抗药性风险评估方面的报道,因此本试验旨在评估黄瓜霜霉病菌对烯炀菌酯的抗性风险,建立合理的抗药性治理措施,以避免和延缓抗药性的产生。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1) 供试黄瓜品种为长春密刺(市售);

2) 供试黄瓜霜霉病菌菌株,由中国农业大学种子病理药理研究室从北京市郊区、天津、河北、内蒙、湖北未施用过烯炀菌酯的黄瓜栽培地采集分离;

3) 供试药剂烯炀菌酯原药(质量分数为0.98%)由沈阳化工研究院提供。

1.2 试验方法

1) 孢子囊悬浮液配制。黄瓜霜霉病菌采用离体叶片法,在19℃、RH>80%、12h光暗交替的生长间培养,待霉层形成后用4℃灭菌水洗脱孢子囊,配制成含有 1×10^5 个/L孢子囊的悬浮液。

2) 供试药剂的配制。用丙酮将烯炀菌酯原药配制成 $1 \times 10^4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液作为母液,放置于4℃冰箱中备用。进行叶片处理时用无菌水稀释并加入0.005 mg/mL的吐温20,试验以含有相同量吐温20和丙酮的无菌水为空白对照。

3) 供试菌株敏感性测定。采用叶碟保湿法进行毒力测定^[89]。先将叶龄相同的健康叶片制备直径为1.5 cm叶盘,分别置于含有不同量烯炀菌酯的药液中浸泡1 h,每个浓度50个叶盘,然后叶背面朝上分别摆放于与浸泡叶盘相同药液润湿的吸水纸上,将配制好的孢子囊悬浮液10 μL 接种于叶盘中央,置于生长间培养。培养7 d后测量叶盘上的发病面积,计算 EC_{50} ,测定黄瓜霜霉病菌对烯炀菌酯敏

感性。

4) 抗药性突变体的获得。药剂驯化获得抗药性突变体。将孢子囊悬浮液接种于用0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 烯炀菌酯浸泡1 h的健康叶片背面,培养7 d,待产生新的孢子囊后,将孢子囊洗脱并接种到新的健康叶片上,每7 d转接一代,并逐渐提高药剂含量,转接多代后,在未经药剂处理的叶片上培养一代,然后测定其对烯炀菌酯的敏感性。紫外诱变获得抗药性突变体。将孢子囊悬浮液在距离25W紫外灯管30 cm处照射10 min,然后接种于0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 烯炀菌酯处理过的叶盘上,置于培养间中培养,待产孢后将孢子囊洗脱,接种于用相同药剂处理过的叶片上,培养并观察其发病情况,确定其是否产生抗药性。

5) 抗药性突变体对烯炀菌酯的抗性水平测定。将经药剂驯化和紫外诱变获得的抗药性突变体在无药的叶片上培养一代后,采用叶碟保湿法进行抗性水平测定,方法与3)相同。

6) 抗药性突变体致病力。采用半叶法测定抗药性突变体的致病力,将同一叶龄的健康叶片叶背朝上置于吸水纸上,在叶片的一半接种亲本菌株孢子囊悬浮液,另一半接种相同孢子囊含量的抗药性突变体孢子囊悬浮液,每滴10 μL ,每个液滴之间间隔2 cm,置于生长间培养。7 d后测量发病面积,比较抗药性菌株和亲本菌株之间致病力差异。

7) 抗药性突变体抗药稳定性测定。将经药剂驯化和紫外诱变获得的抗药性突变体在没有用药剂处理过的健康叶片上继代培养10代以上,然后采用叶碟保湿法测定其对药剂的敏感性^[10711]。

8) 抗药性突变体的适合度测定。用液滴法将相同浓度的亲本菌株和抗药性突变体的孢子囊悬浮液,分别接种于用培养皿保湿培养的直径1.5 cm的叶盘背面,每个叶盘接菌量为10 μL ,每个菌株接菌50个叶盘置于生长间培养^[1215]。比较抗药性突变体和亲本菌株的侵染频率(叶片接菌后的发病率)、病斑面积(叶片接菌后7 d产生的病斑面积)和产孢能力(叶盘接菌7 d后,单位面积产生孢子囊的数量)3个指标,并根据这3个指标计算菌株的适合度指数(综合适合度指数=侵染频率 \times 病斑面积 \times 产孢能力)。

9) 抗药性突变体的竞争力测定。将抗药性突变体的孢子囊悬浮液和相同浓度亲本菌株按 $\text{CK}_{\text{抗性菌株}}$ 、8 2.5 5、2 8和 $\text{CK}_{\text{敏感菌株}}$ 的比例混合,采用液滴法分别接种于未经药剂处理和用亲本菌株最小抑制浓

度药剂处理的叶盘背面,每处理重复 50 个叶盘,置于生长间中培养,7 d 后测量叶盘的发病面积,然后将未经药剂处理的叶盘上的孢子囊洗脱,按上述方法连续培养多代,根据用药剂处理过的叶盘发病情况估算抗药性突变体在混合群体中的比例^[16-17]。抗药性突变体的频率 = (药剂处理叶盘上的发病面积/未用药剂处理叶盘的发病面积) × 100%。

2 结果与分析

2.1 黄瓜霜霉病菌对烯肟菌酯敏感基线的建立

采用叶碟保湿法测定黄瓜霜霉病菌 52 个菌株对烯肟菌酯的敏感性,EC₅₀ 差异较小,其中最大为 0.031 3 μg/mL,最小为 0.003 0 μg/mL,平均 EC₅₀ 为 (0.010 1 ± 0.003 1) μg/mL。52 株病菌对烯肟菌酯的敏感性频率分布呈连续单峰曲线,接近正态分布,没有出现敏感性下降的抗药性群体,这些病菌均为烯肟菌酯野生敏感菌株,因此可以采用这些菌株的平均 EC₅₀ 作为黄瓜霜霉病菌对烯肟菌酯的敏感基线(图 1)。

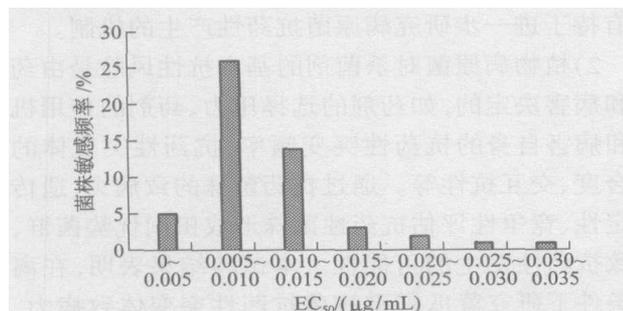


图 1 黄瓜霜霉病菌 52 个菌株对烯肟菌酯的敏感性频率分布

Fig. 1 Baseline sensitivity distribution of 52 strains of *P. cubensis* to enostrobin

2.2 抗药性突变体的获得和抗药性水平测定

通过紫外诱变和药剂驯化的方法共获得黄瓜霜霉病菌抗药性突变体 10 株。采用叶碟保湿培养法测定黄瓜霜霉病菌抗药性突变体对烯肟菌酯的敏感性,试验结果表明(表 1),黄瓜霜霉病菌抗药性突变体对烯肟菌酯的敏感性都明显下降,EC₅₀ 为 1 ~ 5 μg/mL,抗药性倍数为 80 ~ 502 倍。

2.3 抗药性突变体的致病力和抗性稳定性测定

经 SAS 软件分析,烯肟菌酯抗药性突变体的发病面积与亲本菌株之间没有明显差异(表 2、3),表明烯肟菌酯抗药性突变体与亲本菌株之间致病力无显著差异。抗性倍数较低的抗药性突变体 CR1、CR2 在继代培养 10 代后 EC₅₀ 和抗性倍数有所下降,

表 1 黄瓜霜霉病菌抗药性突变体的抗药性水平

Table 1 Resistance level of the enostrobin resistance mutants of *P. cubensis*

| 菌株 | EC ₅₀ / (μg/mL) | 抗药性倍数 | 菌株 | EC ₅₀ / (μg/mL) | 抗药性倍数 |
|-----|----------------------------|--------|------|----------------------------|--------|
| CR1 | 4.23 | 82.70 | CR6 | 3.45 | 502.05 |
| CR2 | 4.10 | 80.21 | CR7 | 1.37 | 211.59 |
| CR3 | 1.70 | 160.26 | CR8 | 2.29 | 352.66 |
| CR4 | 1.68 | 159.08 | CR9 | 1.22 | 187.21 |
| CR5 | 2.75 | 400.78 | CR10 | 2.12 | 326.77 |

注:抗性倍数 = 抗药性突变体的 EC₅₀/ 亲本菌株的 EC₅₀

抗性倍数较高的抗药性突变体 CR5、CR6 在继代培养 10 代后 EC₅₀ 和抗性倍数有所上升,但经 SAS 软件分析差异不显著,表明黄瓜霜霉病菌抗药性突变体抗性稳定。

表 2 黄瓜霜霉病菌抗药性突变体的致病力测定

Table 2 Pathogenicity of patent and resistant strains to enostrobin on detached healthy leaves

| 亲本菌株 | 病斑面积/ mm ² | 抗药性突变体 | 病斑面积/ mm ² |
|------|-----------------------|--------|-------------------------------|
| C3 | (32.91 ± 5.83) A | CR3 | (26.67 ± 7.58) A [*] |
| C4 | (74.58 ± 19.83) A | CR4 | (57.92 ± 21.10) A |
| C5 | (33.81 ± 3.98) A | CR5 | (32.5 ± 3.16) A |
| C6 | (91.07 ± 25.7) A | CR6 | (89.29 ± 42.7) A |

注:相同字母代表 $P=0.01$,没有明显差异,下同。

表 3 黄瓜霜霉病菌抗药性突变体的抗药稳定性测定

Table 3 Stability of the resistant mutants of *P. cubensis* to enostrobin

| 抗药性突变体 | EC ₅₀ / 抗药性倍数 | |
|--------|--------------------------|----------------|
| | 第 1 代 | 第 10 代 |
| CR1 | 4.23 A/ 82.70 | 2.60 A/ 51.93 |
| CR2 | 4.09 A/ 80.21 | 2.65 A/ 50.97 |
| CR5 | 2.75 A/ 400.78 | 3.11 A/ 451.86 |
| CR6 | 3.45 A/ 502.05 | 3.79 A/ 552.60 |

注:EC₅₀ 为质量浓度,μg/mL。

2.4 抗药性突变体的适合度测定

采用离体叶盘法测定亲本菌株和抗药性突变体的适合度,试验结果(表 4)表明,在 4 株抗药性突变体中,CR3、CR5、CR6 适合度综合指数均略低于亲本菌株,经 SAS 分析,不存在显著差异;但抗药性突

变体 CR4 的适合度综合指数明显高于亲本菌株 C4。

表 4 黄瓜霜霉病菌抗药性突变体的适合度测定

Table 4 Fitness parameters of parent strains and resistant mutants to enostrobin

| 菌株 | 适合度指数 | | | |
|-----|--------|-----------|------------|------------|
| | 侵染频率 | 病斑面积 | 产孢能力 | 综合适合度指数 |
| C3 | 1.00 A | 202.12 AB | 123.82 CD | 25 762 BCD |
| CR3 | 0.97 A | 171.76 AB | 107.45 D | 18 385 CD |
| C4 | 0.91 B | 167.19 AB | 105.82 D | 17 472 D |
| CR4 | 1.00 A | 242.35 A | 162.55 CD | 32 456 AB |
| C5 | 1.00 A | 118.13 B | 317.43 AB | 36 684 AB |
| CR5 | 0.91 B | 146.07 AB | 241.12 ABC | 25 808 ABC |
| C6 | 0.88 B | 120.48 B | 351.20 A | 39 120 A |
| CR6 | 0.94 A | 150.69 AB | 218.78 BCD | 32 090 AB |

注:综合适合度指数 = 侵染频率 × 病斑面积 × 产孢能力。C3 ~ C6 为亲本菌株;CR3 ~ CR6 为抗药性突变体。

2.5 抗药性突变体的竞争力测定

烯炔菌酯亲本菌株与抗药性突变体按不同比例混合接种,培养一代后,抗药性突变体的频率与孢子囊混合液中抗药性突变体所占比例相似,培养 7 代后,亲本菌株与抗性突变体以 8:2 和 2:8 和混合比例接种的叶片上抗药性突变体的频率与接种前相比明显升高,其余比例接种抗药性突变体的频率没有明显变化,试验结果(图 2)表明,随转接次数增加,部分混合比例中抗药性突变体的频率逐渐的提高,说明黄瓜霜霉病抗药性突变体室内竞争力优于亲本菌株或与亲本菌株相当。

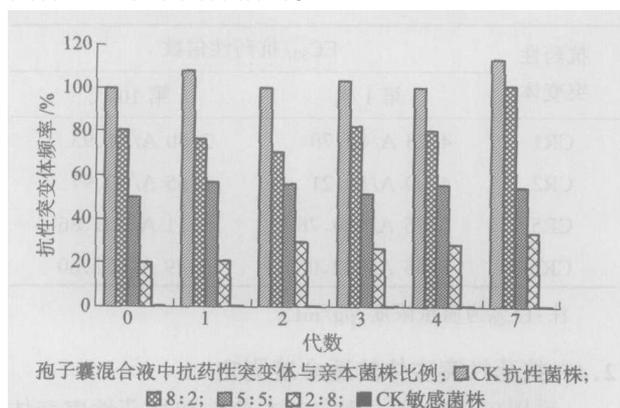


图 2 抗药性突变体与亲本菌株竞争力测定

Fig. 2 Competition between parent strains and resistant mutants

3 结论与讨论

本试验采用叶碟保湿法测定 52 株黄瓜霜霉病菌对烯炔菌酯的敏感性,其敏感频率分布图接近正态分布,敏感性最低和最高的菌株 EC_{50} 相差 10 倍,表明黄瓜霜霉病菌对烯炔菌酯的敏感性变化范围很窄;因此本试验测定的敏感性基线适用于田间抗药性检测和监测。

1) 张舒亚等^[1]曾报道病原菌对甲氧丙烯酸酯类杀菌剂抗药性产生主要是由于病原菌线粒体的 *cytb* 基因发生单碱基突变,而且不同的突变位点代表了不同的抗药水平。本试验通过药剂驯化和紫外诱变在室内获得了抗药性水平不同的黄瓜霜霉病菌抗烯炔菌酯突变体,其抗药性水平在 80 ~ 502 倍之间,而且抗药突变体稳定性虽然没有显著差异;但是变化趋势明显不同,抗药性水平较低的突变体 EC_{50} 略有降低,抗药性水平较高的突变体 EC_{50} 有所升高,可能是由于不同抗药水平突变体其 *cytb* 基因单碱基突变位点不同,或是抗药性产生的机制不同,这还有待于进一步研究病原菌抗药性产生的机制。

2) 植物病原菌对杀菌剂的基本抗性风险是由药剂和病害决定的,如药剂的选择压力、药剂的作用机制和病害自身的抗药性突变频率、抗药性突变体的适合度、交互抗性等。通过抗药菌株的致病力、遗传稳定性、竞争性评估抗药性菌株形成田间优势菌群、导致抗药性发生的可能性。本试验结果表明,在离体条件下研究黄瓜霜霉病菌抗药性突变体致病力、适合度和竞争力与亲本敏感菌株相比没有明显差异,或优于亲本菌株;交互抗药性烯炔菌酯与腈嘧菌酯之间存在正交互抗药性,与氟吗啉、霜脲氰和甲霜灵之间无交互抗药性。综合分析表明,黄瓜霜霉病菌对烯炔菌酯具有较高的抗药性风险,这可为田间抗药性风险评估和指导科学施药提供依据和参考。同时在使用该杀菌剂时,采取避免任意加大使用剂量,减小药剂的选择压力;避免频繁用药,适当减少用药次数;多用混剂或将烯炔菌酯与氟吗啉或其他与之无交互抗药性的杀菌剂轮换使用,以避免或延缓抗药性的产生。

参 考 文 献

- [1] 张舒亚,周明国. 甲氧丙烯酸酯类杀菌剂的生物学及应用技术研究[M]. 周明国. 中国植物病害化学防治研究(第 3 卷). 北京:中国农业科学技术出版社,

- 2002:1~10
- [2] 司乃国,刘君丽,张宗俭. 甲氧丙烯酸酯类杀菌剂的开发与应用[M]. 周明国. 中国植物病害化学防治研究(第2卷). 北京:中国农业科学技术出版社,2000:16~19
- [3] Dave W Bartlett, John M Clough, Jeremy R Godwin, et al. Review the strobil fungicides[J]. Pest Management Science, 2002, 58: 649~662
- [4] 张国生. 甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂的应用、开发现状及展望[J]. 农药科学与管理, 2003, 24(12): 30~34
- [5] 司乃国,刘君丽,李志念,等. 创制杀菌剂烯肟菌酯生物活性及应用研究()- 黄瓜霜霉病[J]. 农药, 2003, 42(10): 36~38
- [6] 司乃国. 我国创制杀菌剂的研究与开发[J]. 农药, 2003, 42(9): 6~8
- [7] 司乃国,李志念,刘君丽,等. 新广谱杀菌剂 SYP- Z071 的生物活性评价[J]. 浙江化工, 2000(增刊): 94~96
- [8] Schepers H T A M. Persistence of resistance to fungicides in *Sphaerotheca fuliginea* [J]. Neth J Plant pathol, 1984, 90: 165~171
- [9] Ishii H, Fraaije B A, Hollomon D W. Occurrence and molecular characterization of strobilurin resistance in cucumber powdery mildew and downy mildew [J]. Phytopathology, 2001, 91: 1166~1171
- [10] Bruin G C A, Edgington L V. Induction of fungal resistance to metalaxyl by ultraviolet irradiation [J]. Phytopathology, 1982, 72(5): 477~480
- [11] Joseph M C, Coffey M D. Development of laboratory resistance to metalaxyl in phenylamide fungicides in *Phytophthora infestans* [J]. Phytopathology, 1999, 78: 754~760
- [12] Tooley P W, Sweigard J A, Fry W E. Fitness and virulence of *Phytophthora infestans* isolates from sexual and asexual populations [J]. Phytopathology, 1986, 76(11): 1209~1212
- [13] Kadish D, Cohen Y. Fitness of *Phytophthora infestans* isolates from metalaxyl-sensitive and -resistant populations [J]. Phytopathology, 1988, 78(7): 912~915
- [14] Kadish D, Cohen Y. Competition between metalaxyl-sensitive and metalaxyl-resistant isolates of *Phytophthora infestans* in the absence of metalaxyl [J]. Plant Pathology, 1988, 37(4): 558~564
- [15] 王文桥,刘国容,张小风,等. 葡萄霜霉病菌和马铃薯晚疫病病菌对三种杀菌剂的抗药性风险研究[J]. 植物病理学报, 2000, 30(1): 48~52
- [16] Cohen Y, Reuveni M, Samoucha Y. Competition between metalaxyl-resistant and -sensitive strains of *Pseudoperonospora cubensis* on cucumber plants [J]. Phytopathology, 1983, 73(11): 1516~1520
- [17] Cohen Y, Samoucha Y. Competition between oxadixyl-sensitive and -resistant field isolates of *Phytophthora infestans* on fungicide-treated potato crops [J]. Crop Protection, 1990, 9(1): 15~20

科研简讯

我校“棉花转基因抗黄萎病研究”取得突破性进展

我校植物病理系齐俊生博士在导师李怀方、马存教授的指导下,经过 10 年艰苦努力,从海岛棉中分离获得了具有自主知识产权的抗黄萎病基因 At7。通过转基因研究,培育出了高抗黄萎病的丰产新品系。2006 年 8 月 26 日,“棉花转基因抗黄萎病研究成果现场观摩会”在山东省惠民县举行。与会专家、领导对这一成果给予了高度评价,认为利用生物技术从海岛棉中克隆抗病基因导入陆地棉选育高抗黄萎病的棉花株系,是棉花抗黄萎病育种的重大突破,这一国际领先水平的研究成果预示着“棉花癌症”——黄萎病——有望被控制。1935 年传入我国的黄萎病是危害棉花最重要的病害,现被称为棉花第一大害,是继棉铃虫被控制之后影响棉花产量和质量的最主要障碍。目前,我国有 50% 棉田受到黄萎病的危害,每年损失皮棉 1 亿 kg 以上。在黄萎病防治中,化学方法难以凑效,而培育抗病新品种是主要防治方法。目前,陆地棉品种基本不具备抗黄萎病资源,从抗黄萎病的海岛棉中分离克隆抗病基因,然后转入陆地棉,培育抗病丰产品种,成为解决棉花抗黄萎病的有效途径。

(科学技术处供稿)