

# 不同地理来源芦笋茎枯病菌对杀菌剂抗药性的差异

孟凡<sup>1,2</sup> 杨迎青<sup>2</sup> 兰波<sup>2</sup> 李湘民<sup>2</sup>

1. 江西农业大学农学院, 南昌 330045; 2. 江西省农业科学院植物保护研究所, 南昌 330200

**摘要** 为明确不同省份芦笋茎枯病菌对内吸性和保护性杀菌剂抗药性的差异, 采用菌丝生长速率法测定了 6 个省 24 个菌株对多菌灵和代森锰锌 2 种杀菌剂的抗药水平, 并比较了其差异。结果表明: 各省份菌株对 2 种杀菌剂的抗药性均存在明显差异, 其中山东省菌株对多菌灵的抗药性最强, 平均  $EC_{50}$  值为 1.10 mg/L, 江西省和福建省菌株次之, 平均  $EC_{50}$  值分别为 0.58 mg/L 和 0.33 mg/L; 福建省菌株对代森锰锌的抗药性最强, 平均  $EC_{50}$  值为 34.53 mg/L, 河北省和山东省菌株次之, 平均  $EC_{50}$  值分别为 15.88 mg/L 和 14.19 mg/L。多菌灵相对代森锰锌更易产生抗药性, 其抗药菌株为 7 个, 平均抗性水平为 3.66, 抗性频率为 29.17%; 而代森锰锌抗性菌株为 4 个, 平均抗性水平为 1.90, 抗性频率为 16.67%。24 个菌株中, SD4 对多菌灵和代森锰锌的抗药性均较强, 抗性水平分别为 10.44 和 3.01, 表现出多抗性。

**关键词** 芦笋茎枯病; 天门冬拟茎点霉; 地理来源; 杀菌剂; 抗药性

**中图分类号** S 481<sup>+</sup>.4; S 482.2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2013)05-0061-05

芦笋 *Asparagus officinalis* Linne 又称石刁柏, 是世界十大名菜之一, 在国际市场上被称为蔬菜之王<sup>[1-3]</sup>。茎枯病是芦笋上的第一大病害, 常造成毁灭性损失, 严重影响中国芦笋的产量和质量<sup>[4]</sup>。该病由天门冬拟茎点霉 *Phomopsis asparagi* (Sacc.) Bubak 侵染引起<sup>[5-8]</sup>。茎枯病的发生需要湿热气候条件, 欧美芦笋主产区均为冷凉气候, 故在欧美国家基本不发生茎枯病, 相应的研究报道也较少<sup>[9-10]</sup>。

目前, 对芦笋茎枯病 (asparagus stem blight disease) 的防治主要以化学防治为主, 但由于多年来大量使用化学药剂防治导致该病菌在不少地区出现了较强的抗药性而使农药的效果大打折扣。杀菌剂主要分为 2 类: 一类是具高效内吸作用的内吸性杀菌剂, 如多菌灵属于专化性强的选择性内吸杀菌剂; 另一类是具保护治疗作用的保护性杀菌剂, 如双二硫代氨基甲酸酯类的代森锰锌就具有广谱保护治疗作用<sup>[11]</sup>。 $EC_{50}$  (median effect concentration, 有效中浓度或半数有效浓度) 值是衡量杀菌剂毒力的重要指标, 其大小的改变程度是产生抗药性的标志<sup>[12]</sup>。前人测定了多菌灵、百菌清、代森锰锌等杀菌剂对芦笋茎枯病菌的毒力作用<sup>[13-15]</sup>, 但尚未有不

同地理来源的不同菌株对内吸性和保护性这 2 类杀菌剂抗药性差异的相关报道。笔者测定了不同地理来源芦笋茎枯病菌对多菌灵和代森锰锌的抗药水平, 旨在明确不同省份菌株对 2 类杀菌剂抗药性的差异, 为科学防治该病提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试药剂

供试 80% 多菌灵可湿性粉剂, 美国仙农有限公司产品; 80% 代森锰锌可湿性粉剂, 陕西先农生物科技有限公司产品。

### 1.2 供试菌株

供试 24 个芦笋茎枯病菌菌株均由笔者所在实验室分离与保存, 分别来自山东 (SD1-4)、山西 (SX3-6)、河北 (HB1-4)、江西 (JX1-3、JX5)、福建 (FJ1、F3-5) 和海南 (HN1-4) 等 6 个省, 采用形态学和分子生物学方法鉴定其为天门冬拟茎点霉 *Phomopsis asparagi* (Sacc.) Bubak<sup>[7]</sup>。

### 1.3 测定方法

采用生长速率法测定杀菌剂的抑菌作用<sup>[16-17]</sup>。用 5 mm 直径打孔器在长满菌丝的 PDA 平板上打

收稿日期: 2013-03-04

基金项目: 公益性行业 (农业) 科研专项 (201003074)、国家重点基础研究发展计划 (2011CB111603) 和江西省农业科学院创新基金 (2011CBS006)

孟凡, 硕士研究生。研究方向: 植物病理学。E-mail: mf\_wstthh@sina.com

通信作者: 李湘民, 博士, 研究员。研究方向: 植物病理学。E-mail: xml1025@yahoo.com.cn

孔,将菌丝块接种于不同质量浓度(代森锰锌:0、1、3、5、7、9  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;多菌灵:0.00、0.05、0.15、0.25、0.35、0.45  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的含药 PDA 平板上<sup>[18]</sup>,以无菌水作空白对照,每处理 4 个重复。置于 26  $^{\circ}\text{C}$  温箱培养 4~7 d 后,用十字交叉法测量菌落直径。

#### 1.4 数据处理

将药剂浓度和抑制率输入 DPS 软件求得毒力回归方程、相关系数、 $\text{EC}_{50}$  值。最后根据野生敏感型病原群体对药剂敏感性为正态分布的原理建立笋茎枯病菌对多菌灵和代森锰锌的敏感基线图,确定敏感基线。

抗性水平 = 供试菌株  $\text{EC}_{50}$  / 敏感基线。抗性水平  $< 3$  为敏感菌株;  $3 <$  抗性水平  $< 10$  为低抗菌株;  $10 <$  抗性水平  $< 100$  为中抗菌株; 抗性水平  $> 100$  为高抗菌株。

菌丝生长相对抑制率 = (对照菌落直径 - 处理菌落直径) / (对照菌落直径 - 6)  $\times 100\%$ 。

#### 1.5 统计分析

分别计算 24 个供试笋茎枯病菌菌株对 2 种杀菌剂的  $\text{EC}_{50}$  值及抗药水平,分析并比较不同省份病菌菌株对多菌灵和代森锰锌 2 种杀菌剂抗药水平的差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 芦笋茎枯病菌对多菌灵的抗药性

1) 不同菌株抗药性的差异。芦笋茎枯病菌对代森锰锌的敏感性分布如图 1 所示,其敏感性频率分布呈不规则的正态分布,说明部分菌株已出现抗药性,存在抗药性亚群体。

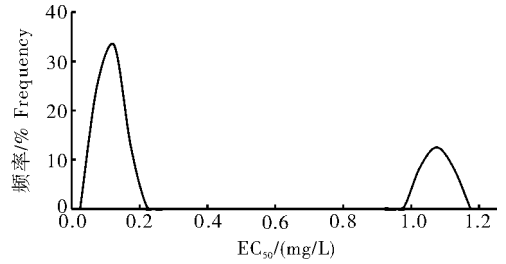


图 1 芦笋茎枯病菌对多菌灵敏感性的频率分布

Fig. 1 Frequency distribution of asparagus stem blight fungus on carbendazim

求出左侧似正态分布曲线范围内敏感性菌株群体的敏感基线  $\text{EC}_{50} = 0.053 \text{ mg}/\text{L}$  为芦笋茎枯病菌对多菌灵的敏感性基线。以此基线为标准,SD2-4、JX2 的抗性水平在 10~100 之间,为中抗菌株;SD1、FJ4 和 JX5 抗性水平在 3~10 之间,为低抗菌株;其他菌株为敏感菌株(表 1)。

表 1 24 个菌株对多菌灵的抗药性

Table 1 Resistance of 24 strains on carbendazim

菌株 Strains	毒力方程 Virulent functions	相关系数 Correlation coefficient	$\text{EC}_{50}$ 值/(mg/L) $\text{EC}_{50}$ values	抗性水平 Resistant levels
FJ1	$y = 7.56572 + 2.64843x$	0.95946	0.10746	1.00
FJ3	$y = 8.60968 + 3.15486x$	0.99764	0.07175	0.67
FJ4	$y = 4.98223 + 0.99773x$	0.96548	1.04185	9.74
FJ5	$y = 7.86626 + 0.62292x$	0.98879	0.10045	0.94
SD1	$y = 4.97819 + 0.97322x$	0.96240	1.05296	9.84
SD2	$y = 4.96010 + 0.96521x$	0.96577	1.09987	10.28
SD3	$y = 4.95157 + 0.96535x$	0.97667	1.12246	10.49
SD4	$y = 4.94743 + 1.09407x$	0.96830	1.11699	10.44
SX3	$y = 6.65012 + 2.25015x$	0.96856	0.18478	1.73
SX4	$y = 8.02672 + 3.93636x$	0.99733	0.17025	1.59
SX5	$y = 7.33072 + 3.25394x$	0.98873	0.19219	1.80
SX6	$y = 6.63723 + 1.44675x$	0.96539	0.07385	0.69
JX1	$y = 7.10935 + 1.72275x$	0.95174	0.05965	0.56
JX2	$y = 4.96357 + 0.92973x$	0.93296	1.09441	10.23
JX3	$y = 9.26494 + 4.33457x$	0.99814	0.10377	0.97
JX5	$y = 4.97999 + 0.95400x$	0.96676	1.04948	9.81
HB1	$y = 7.61937 + 2.72457x$	0.99176	0.10930	1.02
HB2	$y = 7.74955 + 2.74999x$	0.99942	0.10004	0.93
HB3	$y = 9.86449 + 4.95311x$	0.99737	0.10421	0.97
HB4	$y = 8.10983 + 3.40723x$	0.99746	0.12226	1.14
HN1	$y = 9.14556 + 3.49949x$	1.00000	0.06537	0.61
HN2	$y = 11.3597 + 5.96760x$	0.99864	0.08596	0.80
HN3	$y = 9.51892 + 4.71320x$	0.99136	0.10996	1.03
HN4	$y = 8.20751 + 2.51604x$	0.99998	0.05311	0.50

2)不同省份菌株抗药性的差异。测定结果表明:各省份芦笋茎枯病菌菌株对多菌灵的抗药性存在明显差异,其中山东省菌株的抗药性最强,江西省和福建省菌株次之。

山东省芦笋茎枯病菌菌株的平均 EC<sub>50</sub> 值最高,

为 1.10 mg/L,最高抗性水平为中抗,抗性频率为 100.00%;江西省菌株的平均 EC<sub>50</sub> 值为 0.58 mg/L,最高抗性水平为中抗,抗性频率为 50.00%;福建省菌株的平均 EC<sub>50</sub> 值为 0.33 mg/L,最高抗性水平为低抗,抗性频率为 25.00%(表 2)。

表 2 不同省份菌株对多菌灵抗药性的差异

Table 2 Resistance distinction of strains from different provinces on carbendazim

省份 Provinces	抗药菌株数 Numbers of resistant strains	平均 EC <sub>50</sub> /(mg/L) Average EC <sub>50</sub>	平均抗性水平 Average resistant level	最高抗性水平 Highest resistance	抗性频率/% Resistant frequency
福建 Fujian	1	0.33	3.09	低抗 Low resistance	25.00
山东 Shandong	4	1.10	10.26	中抗 Moderate resistance	100.00
山西 Shanxi	0	0.16	1.45	敏感 Sensitivity	0.00
江西 Jiangxi	2	0.58	5.39	中抗 Moderate resistance	50.00
河北 Hebei	0	0.11	1.02	敏感 Sensitivity	0.00
海南 Hainan	0	0.08	0.74	敏感 Sensitivity	0.00

2.2 芦笋茎枯病菌对代森锰锌的抗药性

1)不同菌株抗药性的差异。芦笋茎枯病菌对代森锰锌的敏感性分布如图 2 所示,其敏感性频率分布呈不规则的正态分布,说明部分菌株已表现出抗药性,存在抗药性亚群体。求出左侧近正态分布曲线范围内敏感性菌株群体的平均 EC<sub>50</sub> = 7.48 mg/L,即为芦笋茎枯病菌对代森锰锌的敏感性基线。以此基线为标准,FJ1 抗性水平在 10~100 之间,为中抗水平;SD4、HB1-2 抗性水平在 3~10 之间,为低抗菌株;其他菌株为敏感菌株(表 3)。

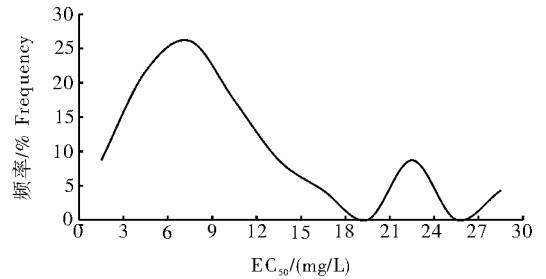


图 2 芦笋茎枯病菌对代森锰锌的敏感性分布

Fig.2 Frequency distribution of asparagus stem blight fungus on mancozeb

表 3 24 个菌株对代森锰锌的抗药性

Table 3 Resistance of 24 strains on mancozeb

菌株 Strains	毒力方程 Virulent functions	相关系数 Correlation coefficient	EC <sub>50</sub> 值/(mg/L) EC <sub>50</sub> values	抗性水平 Resistant levels
FJ1	y=3.631 73+0.671 21x	0.948 23	109.277 15	14.61
FJ3	y=3.914 86+1.042 56x	0.974 71	10.985 90	1.47
FJ4	y=4.264 13+0.747 31x	0.976 67	9.653 82	1.29
FJ5	y=3.758 03+1.359 41x	0.992 69	8.196 09	1.10
SD1	y=4.584 94+0.431 34x	0.963 56	9.167 43	1.23
SD2	y=3.193 71+1.470 33x	0.932 55	16.923 85	2.26
SD3	y=3.972 69+1.126 28x	0.977 52	8.168 27	1.09
SD4	y=4.283 12+0.530 05x	0.974 53	22.515 63	3.01
SX3	y=4.031 44+1.023 97x	0.985 14	8.828 51	1.18
SX4	y=2.480 93+2.157 65x	0.970 93	14.706 33	1.97
SX5	y=4.307 49+0.623 73x	0.971 87	12.890 28	1.72
SX6	y=4.439 35+1.019 94x	0.928 59	3.545 62	0.47
JX1	y=4.059 20+1.343 71x	0.948 51	5.013 63	0.67
JX2	y=4.333 79+0.994 18x	0.996 38	4.678 54	0.63
JX3	y=4.105 82+1.445 10x	0.933 75	4.156 86	0.56
JX5	y=4.203 91+0.838 82x	0.996 85	8.893 35	1.19
HB1	y=4.079 35+0.672 29x	0.966 83	23.411 23	3.13
HB2	y=4.037 77+0.670 34x	0.974 68	27.254 27	3.64
HB3	y=4.068 80+1.570 95x	0.960 91	3.915 31	0.52
HB4	y=1.997 96+3.156 67x	0.983 13	8.933 35	1.19
HN1	y=4.986 14+0.410 09x	0.994 20	1.080 94	0.14
HN2	y=3.925 12+1.074 28x	0.979 59	10.012 76	1.34
HN3	y=-0.052 52+5.541 26x	0.982 43	8.162 06	1.09
HN4	y=4.934 07+2.516 04x	0.999 98	1.062 19	0.14

2)不同省份菌株抗药性的差异。测定结果表明:各省份芦笋茎枯病菌菌株对代森锰锌的抗药性存在明显差异,其中福建省菌株的抗药性最强,河北省和山东省菌株次之。

福建省芦笋茎枯病菌菌株的平均  $EC_{50}$  值最高,

为 34.53 mg/L,最高抗性水平为中抗,抗性频率为 25.00%;河北省菌株的平均  $EC_{50}$  值为 15.88 mg/L,最高抗性水平为低抗,抗性频率为 50.00%;山东省菌株的平均  $EC_{50}$  值为 14.19 mg/L,最高抗性水平为低抗,抗性频率为 25.00%(表 4)。

表 4 不同省份菌株对代森锰锌的抗性差异

Table 4 Resistance distinction of strains from different provinces on mancozeb

省份 Provinces	抗药菌株数 Numbers of resistant strains	平均 $EC_{50}$ /(mg/L) Average $EC_{50}$	平均抗性水平 Average resistant level	最高抗性水平 Highest resistance	抗性频率/% Resistant frequency
福建 Fujian	1	34.53	4.62	中抗 Moderate resistance	25.00
山东 Shandong	1	14.19	1.90	低抗 Low resistance	25.00
山西 Shanxi	0	9.99	1.34	敏感 Sensitivity	0.00
江西 Jiangxi	0	5.69	0.76	敏感 Sensitivity	0.00
河北 Hebei	2	15.88	2.12	低抗 Low resistance	50.00
海南 Hainan	0	5.08	0.68	敏感 Sensitivity	0.00

### 2.3 芦笋茎枯病菌对 2 种杀菌剂抗药性的差异

测定结果表明:多菌灵相对代森锰锌更易产生抗药性,其抗药菌株数为 7 个,平均抗性水平为 3.66,抗性频率为 29.17%;而代森锰锌抗性菌株数

为 4 个,平均抗性水平为 1.90,抗性频率为 16.67%(表 5)。此外,24 个菌株中 SD4 对多菌灵和代森锰锌的抗药性均较强,抗性水平分别为 10.44 和 3.01,表现出多抗性(表 1,表 3)。

表 5 芦笋茎枯病菌对 2 种杀菌剂抗药性的差异

Table 5 Resistance distinction of asparagus stem blight fungus on the two bactericides

杀菌剂 Bactericides	抗药菌株数 Numbers of resistant strains	平均抗性水平 Average resistant level	最高抗性水平 Highest resistance	抗性频率/% Resistant frequency
多菌灵 Carbendazim	7	3.66	中抗 Moderate resistance	29.17
代森锰锌 Mancozeb	4	1.90	中抗 Moderate resistance	16.67

## 3 讨论

植物病原菌的  $EC_{50}$  值提高 5~10 倍以上为抗药性产生的标准,以  $\max(EC_{50})/\min(EC_{50})$  值的大小为是否产生抗药性的标志<sup>[11]</sup>。本研究利用更可靠的敏感基线法来确定病原菌抗性水平的高低,以供试菌株  $EC_{50}$ /敏感基线的大小确定低抗、中抗和高抗 3 个水平,较准确地测定了 6 个省芦笋茎枯病菌对 2 种杀菌剂的抗药水平。陈方新等<sup>[12]</sup>认为,选择性内吸杀菌剂对病菌的抑制为单一位点的作用方式,并由单基因控制,长期大量使用易导致抗药性的产生。而保护性杀菌剂没有专化性,作用机理比较复杂,对病菌的抑制为多位点的作用方式,不受单基因控制,病原菌不易对其产生抗药性。笔者选取的多菌灵和代森锰锌分别属于内吸性杀菌剂和保护剂,结果表明多菌灵相对代森锰锌更易产生抗药性,支持了陈方新等<sup>[12]</sup>的观点。

前人测定了几种常见杀菌剂对芦笋茎枯病菌的毒力作用,但只限于单一菌株,缺乏不同省份不同菌

株之间抗药性水平的比较<sup>[13-15]</sup>。本试验采用毒力回归法,测定了 6 个省份 24 个菌株对多菌灵和代森锰锌 2 种杀菌剂的抗药性,明确了不同省份菌株对这 2 种杀菌剂的抗药水平差异,研究结果可为不同省份科学用药提供理论依据。

本次试验中菌株 SD4 对多菌灵和代森锰锌的抗药性均较强,抗性水平分别为 10.44 和 3.01,理论上这是多抗性的范畴,而不属于交互抗性。因为交互抗性是一个品系由于相同的抗性机理或相似作用机理或类似化学结构,对选择药剂以外的其他药剂也产生抗药性的现象<sup>[19]</sup>。本试验中的多菌灵和代森锰锌分别属于内吸性和保护性杀菌剂,不具有相同的杀菌机理。菌株 SD4 产生多抗性的机理有待进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] 刘克均,陆悦健,陈永莹,等. 芦笋茎枯病菌的生物学特性[J]. 植物病理学报,1994,24(4):299-304.
- [2] 刘克钧. 芦笋高产栽培实用技术[M]. 北京:中国农业出版社,2001.

- [3] 陈光宇. 芦笋无公害生产技术[M]. 北京:中国农业出版社, 2005.
- [4] 刘志恒, 孙俊, 杨红, 等. 芦笋茎枯病菌生物学特性的研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2008, 39(3): 301-304.
- [5] 刘克均, 张凤如, 陈永查. 芦笋茎枯病原菌的订正[J]. 真菌学报, 1991, 10(4): 329-330.
- [6] 苗华民, 侯绪友, 孟凡明, 等. 芦笋茎枯病原菌及其生物学研究[J]. 植物保护学报, 1991, 18(1): 87-90.
- [7] 杨迎青, 李湘民, 孟凡, 等. 芦笋茎枯病菌的鉴定及区域差异性分析[J]. 植物保护学报, 2012, 39(4): 315-320.
- [8] 杨迎青, 李湘民, 孟凡, 等. 芦笋茎枯病抗性鉴定方法的建立及芦笋抗病种质资源的筛选[J]. 植物病理学报, 2012, 42(6): 649-654.
- [9] UECKER F A, JOHNSON D A. Morphology and taxonomy of species of *Phomopsis* on *Asparagus* [J]. Mycologia, 1991, 83(2): 192-199.
- [10] DAVIS R D. Asparagus stem blight recorded in Australia [J]. Australasian Plant Pathology, 2001, 30(2): 181-182.
- [11] 杨谦. 植物病原菌抗药性分子生物学[M]. 北京:科学出版社, 2003:3.
- [12] 陈方新, 齐永霞, 吴红星, 等. 苎麻疫霉对几种杀菌剂的离体敏感性测定[J]. 中国农学通报, 2006, 22(4): 375-377.
- [13] 彭明生, 冯晓案. 芦笋茎枯病的药剂防治试验[J]. 江苏农业科学, 1995(5): 48-49.
- [14] 林佩力, 汪国强, 梁训义. 不同农药对芦笋茎枯病菌联合作用的毒力测定[J]. 植物保护, 1995, 21(6): 35-37.
- [15] 康业斌. 多菌灵、百菌清对天门冬拟茎点霉的室内联合毒力测定[J]. 植物保护, 2000, 26(2): 42-43.
- [16] 黄彰欣. 植物化学保护实验指导[M]. 北京:中国农业出版社, 1993:56-59.
- [17] 郑露, 董伊丹, 吕茹婧, 等. 几种杀菌剂对大蒜白斑病的防治效果[J]. 华中农业大学学报, 2009, 28(2): 151-155.
- [18] 方中达. 植病研究方法[M]. 3版. 北京:中国农业出版社, 1998: 40, 46-50.
- [19] 赵善欢. 植物化学保护[M]. 3版. 北京:中国农业出版社, 1999: 240.

## Difference of fungicide resistance of asparagus stem blight fungus from different geographic origins

MENG Fan<sup>1,2</sup> YANG Ying-qing<sup>2</sup> LAN Bo<sup>2</sup> LI Xiang-min<sup>2</sup>

1. College of Agronomy, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China;

2. Institute of Plant Protection, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang 330200, China

**Abstract** To define the difference of the resistance level of asparagus stem blight fungus *Phomopsis asparagi* (Sacc.) Bubak from different provinces on systemic and protective fungicides, the resistance levels of 24 isolates from 6 provinces on carbendazim and mancozeb were determined by using the mycelial growth rate method. The isolates from Shandong Province expressed the most resistance on carbendazim with an average  $EC_{50}$  value of 1.10 mg/L, followed by the isolates from Jiangxi Province and Fujian Province, with an average  $EC_{50}$  values of 0.58 mg/L and 0.33 mg/L respectively. The isolates from Fujian Province expressed the most resistance on mancozeb with an average  $EC_{50}$  value of 34.53 mg/L, followed by the isolates from Hebei Province and Shandong Province, with average  $EC_{50}$  values of 15.88 mg/L and 14.19 mg/L respectively. Compared to mancozeb, it's easier for carbendazim to produce resistance, with 7 resistant isolates, 3.66 as the resistant level and 29.17% as the resistant frequency, while 4 resistant isolates, with 1.90 as the resistant level and 16.67% as the resistant frequency, were included in mancozeb. Of 24 isolates, SD4 revealed resistance on both of carbendazim and mancozeb, with the resistance levels of 10.44 and 3.01 respectively, which expressed multiresistance.

**Key words** asparagus stem blight disease; *Phomopsis asparagi* (Sacc.) Bubak; geographic origin; fungicide; resistance