

# 西南地区稻瘟病菌对戊唑醇的敏感性基线 建立及抗性监测

鲜菲, 刘顺涛, 李雨, 陈杰, 裴丽丽, 余洋,  
杨宇衡, 毕朝位\*

(西南大学植物保护学院, 重庆 400715)

**摘要:**于2013—2014年分别从重庆市及四川、贵州省的16个区县采集分离获得902株稻瘟病菌,采用菌丝生长速率法测定了其中150个菌株对戊唑醇的敏感性。结果表明:其 $EC_{50}$ 值分布在0.0475~0.5996  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间,平均 $EC_{50}$ 值为 $(0.2154 \pm 0.1497)$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。菌株的不同敏感性频率呈连续单峰曲线分布,因此其平均 $EC_{50}$ 值0.2154  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 可作为田间稻瘟病菌对戊唑醇敏感性检测的参考标准。戊唑醇对菌株的最低抑制浓度(MIC)值 $\leq 4$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,以4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作为抗性菌株监测的区分剂量,测定了各地病原菌对戊唑醇的田间抗性,发现自各地采集分离的902株稻瘟病菌多数对戊唑醇仍表现为敏感,仅2株为低水平抗性。

**关键词:**稻瘟病菌;戊唑醇;敏感性基线;抗性监测

中图分类号:S482.2;S481.4 文献标志码:A 文章编号:1008-7303(2015)06-0753-04

## Sensitivity base-line and resistance detection of *Magnaporthe grisea* to tebuconazole in southwest of China

Xian Fei, Liu Shuntao, Li Yu, Chen Jie, Pei Lili, Yu Yang,  
Yang Yuheng, Bi Chaowei\*

(College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400715, China)

**Abstract:**Nine hundred and two isolates of *Magnaporthe grisea* were isolated from rice neck-panicles collected from 16 counties in Chongqing, Sichuan and Guizhou province in 2013 and 2014. In this study, the sensitivity of 150 isolates of *M. grisea* to tebuconazole was tested by the mycelium growth rate method. The results showed that the  $EC_{50}$  values of *M. grisea* isolates to tebuconazole ranged from 0.0475 to 0.5996  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , which showed a skewed unimodal distribution, suggesting the average of  $EC_{50}$  values (0.2154  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) could be used as the reference of *M. grisea* sensitivity base-line to tebuconazole in the southwest of China. The minimum inhibitory concentration of tebuconazole to *M. grisea* was  $\leq 4$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Using 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  as discriminating dose to screen tebuconazole-resistant isolates, among all 902 isolates, only 2 lowed-resistant isolates were detected.

**Keywords:** *Magnaporthe grisea*; tebuconazole; sensitivity base-line; resistance detection

收稿日期:2015-04-15; 录用日期:2015-10-28.

作者简介:鲜菲,女,硕士研究生,E-mail: huluhagu@163.com; \*毕朝位,通信作者(Author for correspondence),男,副教授,主要从事植物真菌病害及病原菌抗药性研究,E-mail: chwbi@swu.edu.cn

基金项目:公益性行业(农业)科研专项(201303023);中央高校基本科研业务费专项(XDJK2013B042);重庆市自然科学基金(cstc2012jjA80035).

稻瘟病是由灰色大角间座壳菌 (*Magnaporthe grisea*, 无性态为 *Pyricularia oryzae*) 所引起的重要病害,在我国水稻栽培区均有发生,为水稻三大病害之首,目前的防治措施主要是抗病品种选育、药剂防治和栽培管理,其中,化学防治因经济、高效等优点而占据着不可替代的地位<sup>[1]</sup>。但由于化学药剂的常年单一使用,已出现稻瘟病菌抗药性增强和药剂防效降低的现象,稻瘟灵、稻瘟净、异稻瘟净等药剂都已有田间抗性菌株产生<sup>[2-3]</sup>。此外,菌株经过连续驯化后对三环唑的敏感性也会降低<sup>[4]</sup>。因此,关于稻瘟病防治新药剂的研究开发已迫在眉睫。

戊唑醇 (tebuconazole) 是一种高效、广谱、内吸性的 DMIs 类杀菌剂,对作物的多数真菌病害均有良好的防治效果。但由于 DMIs 类杀菌剂的作用位点单一,田间已有多种重要的植物病原真菌对该类杀菌剂产生了不同程度的抗药性<sup>[5-8]</sup>。西南地区是我国稻瘟病的常发区,但不同地域不同年份发病程度不一,常用的防治药剂主要有三环唑、稻瘟灵等,戊唑醇在该地区尚未大面积使用。笔者针对西南地区稻瘟病菌对戊唑醇敏感性基线的建立及抗药性监测进行了研究,以期为戊唑醇在该地区的应用前景评价及合理使用提供参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试材料

1.1.1 菌株 于 2013—2014 年在重庆市及四川、贵州省的 16 个区县采集水稻稻瘟病穗颈瘟标样,通过单孢分离纯化,共获得 902 个稻瘟病菌 *Magnaporthe grisea* 菌株。

1.1.2 药剂 97% 戊唑醇 (tebuconazole) 原药 (湖北康宝泰精细化工有限公司),用丙酮配制为  $1 \times 10^4 \mu\text{g}/\text{mL}$  的母液,4 °C 冰箱保存,备用。

1.1.3 培养基 马铃薯琼脂培养基 (PDA): 马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂粉 20 g,水 1 000 mL。

1.1.4 含药平板 将戊唑醇母液用丙酮稀释成系列浓度,取 100  $\mu\text{L}$  分别加入至 200 mL、约 55 °C 的灭菌培养基中,分装制得含药平板。

### 1.2 试验方法

1.2.1 病原菌的分离、纯化与保存 将所采集的穗颈瘟样品用灭菌水浸泡后保湿培养 2 d,在 PDA 平板上抖孢子培养 2 d,单孢纯化。纯化后的菌株于 4 °C 下保存在 PDA 斜面上。

1.2.2 戊唑醇对稻瘟病菌的最低抑制浓度测定

从保存的菌株中随机选取 30 个野生菌株,于菌落

边缘打取直径 5 mm 的菌丝块,分别接种至含 2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  戊唑醇的 PDA 平板上,以用等量丙酮配制的无药培养基作为对照,每处理重复 3 次。10 d 后观察,以菌株未生长的最低戊唑醇浓度作为戊唑醇对稻瘟病菌野生菌株的最低抑制浓度 (MIC) 值。

1.2.3 稻瘟病菌对戊唑醇敏感性基线的建立 从保存的菌株中随机选取 150 个野生菌株,采用菌丝生长速率法<sup>[9]</sup>测定稻瘟病菌对戊唑醇的敏感性。

将供试菌株于 PDA 培养基上、28 °C 黑暗培养 10 d,于菌落边缘打取直径 5 mm 的菌丝块,分别接种到含 0.062 5、0.125、0.25、0.5、1.0 及 2.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  戊唑醇的 PDA 平板上,以加入等体积丙酮的平板作为对照,每处理重复 3 次。28 °C 黑暗培养,10 d 后用交叉法测量各处理的菌落直径,计算菌丝生长抑制率。

通过 Excel 对各处理组药剂浓度的对数 ( $x$ ) 和菌丝生长抑制率的几率值 ( $Y$ ) 进行线性回归分析,求出线性回归方程,计算戊唑醇对各供试菌株的抑制中浓度 ( $EC_{50}$  值)。根据 150 株野生稻瘟病菌株对戊唑醇的敏感性频率分布,建立敏感性基线<sup>[10]</sup>。

1.2.4 西南地区稻瘟病菌对戊唑醇的田间抗性监测 将全部菌株活化培养 3 d 后,于菌落边缘打取直径 5 mm 的菌丝块,接种至戊唑醇质量浓度为 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的含药平板上,以加入等体积丙酮的平板为对照。28 °C 培养 10 d,观察菌株生长情况,将能在含药平板上生长的菌株重新活化,通过菌丝生长速率法测定其  $EC_{50}$  值,计算其与敏感基线的比值,得到抗性倍数 (resistance factor)。

根据抗性倍数将供试菌株划分为敏感、低抗、中抗和高抗菌株。其中,抗性倍数  $\leq 3$  为敏感菌株;  $3 <$  抗性倍数  $\leq 10$  为低抗菌株;  $10 <$  抗性倍数  $\leq 100$  为中抗菌株; 抗性倍数  $> 100$  为高抗菌株<sup>[11]</sup>。计算各抗性菌株的频率。

## 2 结果与分析

### 2.1 西南地区稻瘟病菌对戊唑醇的敏感性基线

测定结果显示,供试 150 株稻瘟病菌对戊唑醇的敏感性呈连续性分布 (图 1 A),其  $EC_{50}$  值变化范围在 0.047 5 ~ 0.599 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  之间,其中最不敏感菌株的  $EC_{50}$  值是最敏感菌株的 12.62 倍。将其  $EC_{50}$  值划分为几个区间,统计每个区间的菌株数及发生频率,绘制菌株敏感性频率分布图 (图 1 B)。由图 1 可见,供试稻瘟病菌对戊唑醇的敏感性频率

分布呈连续性单峰曲线,未出现敏感性明显下降的抗药性亚群体,因此可将此 150 株敏感菌株的平均  $EC_{50}$  值作为田间菌株抗性监测的参考标准。其  $EC_{50}$  平均值为  $(0.2154 \pm 0.1497) \mu\text{g/mL}$ , MIC 值  $\leq 4 \mu\text{g/mL}$ , 该平均  $EC_{50}$  值  $0.2154 \mu\text{g/mL}$  可作为西南地区稻瘟病菌对戊唑醇敏感性基线的参考值,用于田间抗药性监测。

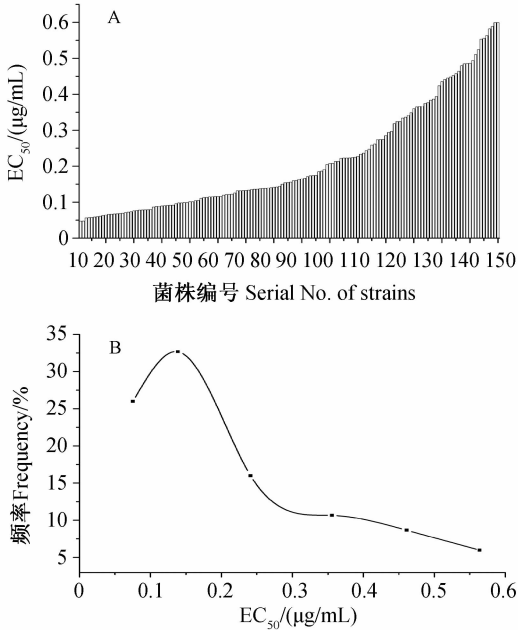


图1 稻瘟病菌对戊唑醇的敏感性(A)及频率分布(B)

Fig. 1 Sensitivity (A) and distribution (B) of  $EC_{50}$  values of 150 isolates of *M. grisea* to tebuconazole

通过 SPSS 软件分析了西南地区 10 个区县的田间稻瘟病菌菌株对戊唑醇的敏感性,结果(表 1)表明,不同地区稻瘟病菌对戊唑醇的敏感性存在显著性差异。其中,四川绵阳菌株最敏感,其平均  $EC_{50}$  值为  $(0.0872 \pm 0.0461) \mu\text{g/mL}$ ;贵州六枝特区和四川宣汉的菌株最不敏感,平均  $EC_{50}$  值分别为  $(0.4570 \pm 0.0855)$  和  $(0.4436 \pm 0.1289) \mu\text{g/mL}$ ;四川绵阳菌株与四川宣汉菌株的敏感性相差 5.09 倍。

## 2.2 西南地区稻瘟病菌对戊唑醇的抗性

以 MIC 值作为田间稻瘟病菌对戊唑醇抗性的区分剂量,对分离于重庆市(永川、酉阳、璧山、武隆、涪陵、忠县、石柱)、四川省(都江堰、宣汉、阆中、绵阳、岳池、雅安、武胜)和贵州省(盘县、六枝特区) 16 个区县的 902 株稻瘟病菌菌株进行抗性监测。结果表明,所采集的病原菌仅四川宣汉和重庆涪陵各有 1 株能在含  $4 \mu\text{g/mL}$  戊唑醇的 PDA 平板上生长,视为疑似抗性菌株。

测定该疑似抗性菌株对戊唑醇的敏感性,得其  $EC_{50}$  值分别为  $0.6512$  和  $0.6557 \mu\text{g/mL}$ ,抗性倍数分别为 3.02 和 3.04。由此可见,西南地区稻瘟病菌对戊唑醇多数仍为敏感菌株,仅极少数出现了低水平抗性。

## 3 小结与讨论

DMIs 类农药属于较易产生抗性的中等风险杀菌剂,而稻瘟病菌属于易产生抗性的高风险病原菌<sup>[12]</sup>。建立病原菌对杀菌剂的敏感性基线是研究

表 1 部分地区稻瘟病菌对戊唑醇的敏感性比较

Table 1 Sensitivity ( $EC_{50}$  value) of *M. grisea* from different areas to tebuconazole

采集地 Location	菌株数 Isolates	$EC_{50}$ 值范围 Range of $EC_{50}$ values/ $(\mu\text{g/mL})$	$EC_{50}$ 平均值 Average of $EC_{50}$ values/ $(\mu\text{g/mL})$
四川宣汉 Sichuan Xuanhan	10	0.236 0 ~ 0.599 5	0.443 6 $\pm$ 0.128 9 a
贵州六枝特区 Guizhou Liuzhi Tequ	8	0.324 4 ~ 0.581 8	0.457 0 $\pm$ 0.085 5 a
重庆涪陵 Chongqing Fulin	13	0.134 4 ~ 0.555 7	0.369 7 $\pm$ 0.141 9 b
四川雅安 Sichuan Ya'an	12	0.078 2 ~ 0.348 8	0.187 4 $\pm$ 0.084 9 c
重庆永川 Chongqing Yongchuan	20	0.055 8 ~ 0.434 7	0.154 6 $\pm$ 0.086 9 cd
重庆璧山 Chongqing Bishan	17	0.064 3 ~ 0.374 3	0.146 5 $\pm$ 0.072 6 cd
四川阆中 Sichuan Langzhong	13	0.072 6 ~ 0.318 7	0.143 2 $\pm$ 0.073 3 cd
重庆酉阳 Chongqing Youyang	8	0.071 0 ~ 0.247 3	0.140 9 $\pm$ 0.061 9 cd
四川岳池 Sichuan Yuechi	18	0.047 5 ~ 0.274 9	0.114 5 $\pm$ 0.061 4 cd
四川绵阳 Sichuan Mianyang	12	0.047 8 ~ 0.204 3	0.087 2 $\pm$ 0.046 1 d

注:表中同列数据后不同字母表示采用 Duncan 氏新复极差法检验数值间差异显著 ( $P > 0.05$ )。

Note: Data in the same column followed by different letters are significantly different by Duncan's new multiple range test ( $P > 0.05$ ).

田间菌株敏感性变化的重要步骤,也是进行抗药性风险分析的基础<sup>[13]</sup>。本研究采用菌丝生长速率法,测定了采自西南地区未使用戊唑醇区域的150株野生稻瘟病菌菌株对戊唑醇的 $EC_{50}$ 值,其平均 $EC_{50}$ 值为 $0.2154\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ,该值与Yan等<sup>[14]</sup>测定的稻瘟病菌野生敏感菌株对戊唑醇的 $EC_{50}$ 值相近,因此可将其作为田间稻瘟病菌对戊唑醇抗性监测的参考标准。在敏感性基线建立过程中,最敏感菌株与最不敏感菌株 $EC_{50}$ 值差异达12.62倍,分别出现在四川岳池与重庆涪陵,且各区县之间的平均 $EC_{50}$ 值存在显著性差异,说明不同地区稻瘟病菌对戊唑醇的敏感性并不一致,推测这可能与各地病原菌本身的差异性有关。

同时,本研究采用 $4\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 作为区分剂量,对西南地区采集的稻瘟病菌进行了田间抗性监测,其中采自四川省和重庆市的菌株对戊唑醇的抗性频率分别为0.33%和0.21%,表明供试菌株对戊唑醇多数仍表现为敏感,仅极少数为低水平抗性,即戊唑醇在西南地区稻瘟病防治中具有较好的应用价值。因此,戊唑醇可作为西南地区稻瘟病防治的候选药剂,但需做好田间抗药性监测,并注意与作用机制不同的药剂混合或交替使用,以延缓抗性的产生,延长药剂使用寿命。

## 参考文献 (Reference):

[1] 张传清,周明国,朱国念. 稻瘟病化学防治药剂的历史沿革与研究现状[J]. 农药学报, 2009, 11(1): 72-80.  
Zhang Chuanqing, Zhou Mingguo, Zhu Guonian. History and research advance of chemicals for controlling rice blast disease [J]. *Chin J Pestic Sci*, 2009, 11(1): 72-80. (in Chinese)

[2] 沈嘉祥. 云南稻瘟病菌抗药性研究[J]. 植物保护学报, 1988, 15(1): 49-54.  
Shen Jiexiang. Studies on the fungicide resistance of *Pyricularia oryzae* from Yunnan province [J]. *Acta Phytophylacica Sinica*, 1988, 15(1): 49-54. (in Chinese)

[3] 彭云良,陈国华,沈瑛. 四川稻瘟病菌对异稻瘟净和稻瘟灵抗药性研究[J]. 西南农业学报, 1991, 4(3): 102-108.  
Peng Yunliang, Chen Guohua, Shen Ying. Resistance to two fungicides in *Pyricularia oryzae* cav. in Sichuan province [J]. *Southwest China J Agric Sci*, 1991, 4(3): 102-108. (in Chinese)

[4] 沈瑛,梁天锡,朱培良,等. 稻瘟病菌对三环唑的抗药性研究[J]. 农药, 1995, 34(2): 9-11.  
Shen Ying, Liang Tianxi, Zhu Peiliang, et al. Development of resistance in *Pyricularia oryzae* to tricyclazole [J]. *Pesticides*, 1995, 34(2): 9-11. (in Chinese)

[5] Akallal R, Debieu D, Lanen C, et al. Inheritance and mechanisms of resistance to tebuconazole, a sterol C14-demethylation inhibitor, in *Nectria haematococca* [J]. *Pestic Biochem Physiol*, 1998, 60(3): 147-166.

[6] 刘英华,王开运,姜兴印,等. 禾谷丝核菌对戊唑醇的抗性及其抗药性菌系生物学特性[J]. 植物保护学报, 2003, 30(4): 423-428.  
Liu Yinghua, Wang Kaiyun, Jiang Xingyin, et al. Resistance of *Rhizoctonia cerealis* to tebuconazole and the biological characters of tebuconazole-resistant strains [J]. *Acta Phytophylacica Sinica*, 2003, 30(4): 423-428. (in Chinese)

[7] Golembiewski R C, Vargas Jr J M, Jones A L, et al. Detection of demethylation inhibitor (DMI) resistance in *Sclerotinia homoeocarpa* populations [J]. *Plant Disease*, 1995, 79: 491-493.

[8] Karaoglaniadis G S, Ioannidis P M, Thanassouloupoulos C C. Reduced sensitivity of *Cercospora beticola* isolates to sterol-demethylation-inhibiting fungicides [J]. *Plant Pathol*, 2000, 49(5): 567-572.

[9] NY/T 1156.2—2006, 农药室内生物测定试验准则[S]. 北京: 中国农业出版社, 2006.  
NY/T 1156.2—2006, Pesticides guidelines for laboratory bioactivity tests [S]. Beijing: China Agriculture Press, 2006. (in Chinese)

[10] Smith F D, Parker D M, Köller W. Sensitivity distribution of *Venturia inaequalis* to the sterol demethylation inhibitor flusilazole: baseline sensitivity and implications for resistance monitoring [J]. *Phytopathology*, 1991, 81: 392-396.

[11] 兰波,李湘民,黄瑞荣,等. 江西省稻瘟病菌对富士一号的抗药性研究[J]. 江西农业大学学报, 2007, 29(3): 351-355.  
Lan Bo, Li Xiangmin, Huang Ruirong, et al. The resistance of different strains of rice blast (*Magnaporthe grisea*) in Jiangxi province to isoprothiolane [J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2007, 29(3): 351-355. (in Chinese)

[12] Brent K J, Hollomon D W. Fungicide Resistance: The Assessment of Risk [M/OL]. (2007) [2015-03-10]. <http://www.frac.info/docs/default-source/publications/monographs/monograph-2.pdf>

[13] 王文桥,马志强,张小风,等. 植物病原菌对杀菌剂抗性风险评估[J]. 农药学报, 2001, 3(1): 6-11.  
Wang Wenqiao, Ma Zhiqiang, Zhang Xiaofeng, et al. Evaluation of risk of resistance in plant pathogenous fungi to fungicides [J]. *Chin J Pestic Sci*, 2001, 3(1): 6-11. (in Chinese)

[14] Yan Xia, Ma Weibin, Li Ya, et al. A sterol 14 $\alpha$ -demethylase is required for conidiation, virulence and for mediating sensitivity to sterol demethylation inhibitors by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* [J]. *Fungal Genet Biol*, 2011, 48(2): 144-153.