

应用电导仪测定番茄灰霉病菌对多菌灵抗药性的初步研究

丁中^{1*}, 刘峰², 慕立义²

(1. 湖南农业大学 植物保护学院, 湖南 长沙 410128; 2. 山东农业大学 植物保护学院, 山东 泰安 271018)

摘要: 1.0 mg/L 和 5.0 mg/L 多菌灵盐酸盐溶液处理灰霉病菌多菌灵敏感菌株和抗性菌株, 用电导仪测定溶液电导率的动态变化, 结果表明: 在敏感菌株存在时, 多菌灵盐酸盐溶液 2 h 后的电导率显著降低, 而抗性菌株存在的溶液中电导率则未见下降。

关键词: 灰霉病菌; 电导率; 多菌灵; 抗药性

中图分类号: S481.4 文献标识码: A 文章编号: 1008-7303(2003)03-0094-03

植物病原菌抗药性的出现将直接导致病害防治的失败, 因此对已有杀菌剂的抗药性及时进行检测, 有利于调整用药品种和防治策略。病原菌的抗药性检测传统上主要采用离体或活体生物测定的方法, 但由于其工作量大、周期长, 限制了监测点和样本的广泛性。近年来采用 PCR 技术结合 Southern 杂交的快速诊断和以单个碱基变化为基础的非探针标志的快速检测方法, 提高了灵敏度和准确性^[1-3]。但该类方法技术含量高, 所需仪器药品昂贵, 在实际应用中受到了限制。石志琦等^[4]曾应用电导仪测定对二甲酰亚胺类杀菌剂产生抗性的核盘菌菌丝体浸出液的电导率, 用菌丝体细胞质电解质的渗漏情况, 来描述抗性菌株对二甲酰亚胺类杀菌剂的排泄机制。作者试图通过多菌灵处理番茄灰霉病菌 *Botrytis cinerea* 菌丝体后, 采用电导仪的测定方法检测多菌灵抗性菌株, 并对其作用原理进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

多菌灵高抗菌株 G3, 采自山东寿光; 多菌灵敏感菌株 X30, 采自山东新泰。2000 年 3~4 月采自上述地方的保护地番茄灰霉病病果自行分离后用 PDA 培养基在 1~4 °C 冰箱中保存。

1.2 供试药剂和主要仪器

98% 多菌灵 (carbendazim) 原药 (山东华阳农药化工集团生产), 用 0.1 mol/L HCl 溶液溶解, 配制成 1 000 mg/L 的多菌灵盐酸盐母液。然后用灭菌去离子水稀释至各所需浓度。

DDS-11A 型电导仪 (上海雷磁仪器厂)。

1.3 抗性检测

1.3.1 离体生物测定 将上述菌株在 25 °C 下培养 3 d, 用直径 5 mm 的打孔器沿菌落边缘截取菌块接种在含多菌灵系列浓度的 PDA 平板上, 按生长速率法进行测定。

1.3.2 电导率测定 将上述菌株同时接种于盛 PD 培养液的培养皿中, 每皿 8 个菌丝块, 静止培养 4 d, 于菌丝对数生长期取出, 除去琼脂块, 用去离子水冲洗 4 次, 真空抽滤后称取菌丝鲜重 2.0 g, 放入 50 mL 锥形瓶中, 分别加入 20 mL 用去离子水稀释的多菌灵盐酸盐药液。多菌灵盐酸盐药液的浓度分别为 1.0 和 5.0 mg/L。

作者简介: 丁中 (1969-), 男, 湖南永顺人, 土家族, 硕士, 讲师, 主要从事农药学教学和杀菌剂抗药性研究

将锥形瓶置于 25 的恒温水浴中, 经 120 r/min 振荡后测定电导率, 以菌丝体加去离子水为对照, 分别测定在 0、15、30、60、120、180、240 min 时的电导率。

2 结果与分析

2.1 离体生物测定结果

离体生物测定结果(表 1)表明, 灰霉病菌多菌灵敏感菌株对多菌灵非常敏感, 其 EC_{50} 为 0.062 0 mg/L, 而多菌灵抗性菌株在含 1 000 mg/L 多菌灵的培养基上仍然能正常生长。

Table 1 The colony diameter of sensitive and high resistant strain to carbendazim on the PDA medium with carbendazim (μ m)

Strain	Carbendazim concentration/mg \cdot L ⁻¹							
	0	0.025	0.05	0.1	0.2	10	100	1 000
X30	50	46.5	33	13	7.5	0	0	0
G3	51	50	51	50.5	51	52	50	49

2.2 电导率测定结果

从图 1、2 可以看出, 在去离子水中由于菌丝体细胞内电解质的外渗, 两菌株 0~120 min 内电导率表现出上升的趋势。用 5、10 mg/L 多菌灵盐酸盐分别处理灰霉菌多菌灵敏感菌株和抗性菌株的菌丝体后, 发现敏感菌株和抗性菌株所在溶液电导率的变化情况明显不同。其中敏感菌株的电导率随时间的变化表现出下降趋势, 180 min 后分别从开始的 62、110 μ S/cm 下降到 18.5、19.5 μ S/cm, 而抗性菌株的电导率在经过短暂的小幅下降后缓慢上升, 2 h 后不再增加。

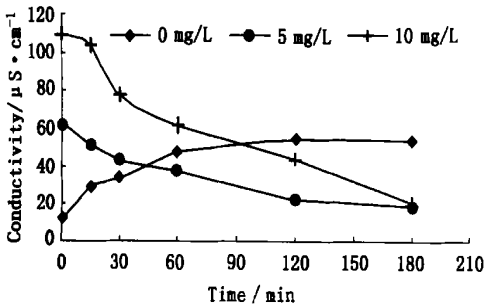


Fig. 1 The change of conductivity in different concentration of carbendazim to sensitive strain

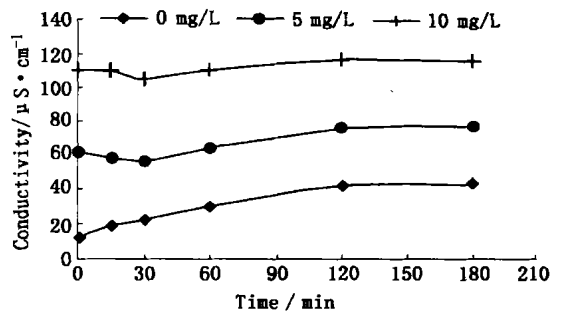


Fig. 2 The change of conductivity in different concentration of carbendazim to high resistant strains

3 讨论

电导率法是衡量溶液中离子强度高低的特征参数, 它与细胞中变化较大的组份诸如 RNA、DNA、氮或碳的含量无关, 而与溶液中的离子浓度有关^[5]。本研究应用电导仪通过测定灰霉菌敏感菌株和抗性菌株菌丝体分别多菌灵盐酸盐溶液中的电导率的动态变化, 发现敏感菌株和抗性菌株对多菌灵盐酸盐溶液的离子浓度产生了不同的影响, 表明采用该方法进行敏感和抗性菌株的鉴定是可能的, 但由于未能采集到中、低抗菌株, 电导率与抗性水平的关系

有待进一步研究。

苯并咪唑类杀菌剂对灰霉菌的抑菌作用主要表现在抑制菌丝的分隔和伸长,其内在的机理为固定形成纺锤体的微管蛋白,使其不能形成微管和其他网架结构,从而破坏细胞的有丝分裂和形态建成。灰霉菌对苯并咪唑类药剂产生抗药性,是由于突变后的微管蛋白对苯并咪唑类药剂的亲合力降低、稳定性增强,从而不容易被药剂固定而失去应有的功能^[6]。Clemons 和 Sisler^[7]曾用多菌灵处理 *Neurospora crassa*, 发现在 2 mg/L 的溶液中,对¹⁴C-标记的多菌灵的吸收在 0.5 h 内就完成了,但被吸收或结合到细胞中去的量则很少。本研究发现用 10 mg/L 多菌灵盐酸盐溶液处理敏感菌株,其电导率由最初的 110 μS/cm,至 3 h 后降到 19.5 μS/cm,表明其吸附在菌丝体表面或进入菌体内的量是较大的。敏感菌株菌丝体细胞壁与抗性菌株的细胞壁结构组成是否存在差异,以及在敏感菌株细胞中除可与多菌灵结合的微管蛋白外,是否还存在可与之结合的物质,该物质是什么,有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 刘德荣, 谢丙炎, 黄三文, 等. 应用特异等位 PCR 快速鉴定灰霉菌菌抗苯来特与乙霉威菌株 [J]. 菌物系统, 2001, 20(2): 238-243
- [2] Luck J, Gillings M R. Rapid identification of benomyl resistant strains of *Botrytis cinerea* using the polymerase chain reaction [J]. *Mycol Res*, 1995, 99: 1483-1488
- [3] Wheeler I, Kendall S J, Butters J A, et al. Using allele specific oligonucleotide probes to characterize benzimidazole resistance in *Rhynchosporium secalis* [J]. *Pestic Sci*, 1995, 43: 201-209
- [4] 石志琦, 周明国, 叶钟音. 核盘菌对菌核净的抗药性机制初探 [J]. 农药学学报, 2000, 2(2): 47-51
- [5] 陈因良, 陈志宏. 细胞培养工程 [M]. 上海: 华东化工学院出版社, 1992
- [6] Davidse L C. Benzimidazole fungicides: Mechanism of action and biological impact [J]. *Ann Rev Phytopathol*, 1986, 24: 43-45
- [7] 郑仲, 李宗成. 内吸性杀菌剂 [M]. 北京: 化学工业出版社, 1983: 198-203

A Preliminary Study on Detecting Resistance of *Botrytis cinerea* to Carbendazim with Conductometer

D N G Zhong^{1*}, L U Feng², M U Li-yi²

(1 College of Plant Protection, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

2 College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

Abstract: A carbendazim-susceptible isolate and a carbendazim-resistant isolate of *Botrytis cinerea* were compared with regard to mycelial growth and the extreme value of conductance upon treatment with the benzimidazole fungicide carbendazim hydrochloride. The result showed that the EC₅₀ value of carbendazim-susceptible isolate was 0.062 0 mg/L, while the carbendazim-resistant isolate formed normal colony on PDA containing 1 000 mg/L carbendazim hydrochloride. Under the treatment of carbendazim hydrochloride with the concentration of 5 or 10 mg/L, the conductivity of carbendazim-sensitive isolate showed a decreasing trend, but that of carbendazim-resistant isolate only changed a little.

Key words: *Botrytis cinerea*; conductivity; carbendazim; resistance