

# 山东临沭花生焦斑菌株多菌灵抗药性的研究

晏立英, 雷 永, 万丽云, 程 柯, 廖伯寿\*

(中国农业科学院油料作物研究所/油料作物生物学与遗传育种重点实验室, 湖北 武汉, 430062)

**摘要:**从山东临沭花生田表现焦斑病症状的花生叶片上分离病原菌,对该地及其他地方采集的焦斑病病原菌进行 rDNA-ITS 区的核苷酸序列分析,测定多菌灵和其他杀菌剂对焦斑病菌的抑制能力,比较了不同焦斑病菌分离物在 PSA 培养基上的生长速率。结果表明,焦斑症状的病原菌为落花生小光壳菌(*Leptosphaerulina arachidicola*)。12 株临沭分离物中 3 株对多菌灵具有抗药性,抗药性比例达 25%。在 PSA 平板上,33.33~1 666.7mg/L 的多菌灵对临沭多菌灵抗性分离物的抑菌率为 9.4%~14.2%,3 333.3mg/L 的多菌灵对抗性菌的抑菌率为 45.2%。多菌灵抗性菌对 20% 戊唑醇+烯炔菌胺悬浮剂,30% 醚菌酯和 70% 代森联同样具有抗药性,但是对 70% 丙森锌可湿性粉剂、30% 戊唑醇悬浮剂、25% 代森锰锌+8% 三唑酮可湿性粉剂、丙环唑乳油等敏感。在 PSA 培养基上培养 12d,临沭多菌灵抗性菌的生长速率曲线呈直线,与其他多菌灵敏感菌的生长速率无显著差异。

**关键词:**花生;焦斑菌;多菌灵;抗药性

**中图分类号:**S435.652 **文献标识码:**A **文章编号:**1007-9084(2015)04-0520-05

## Resistance of peanut scorch spot pathogen

### *Leptosphaerulina arachidicola* to carbendazim in Linshu Shandong

YAN Li-ying, LEI Yong, WAN Li-yun, CHENG Ke, LIAO Bo-shou\*

(Key Laboratory of Biology and Genetics Improvement of Oil Crops, Ministry of Agriculture, Oil Crop Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430062, China)

**Abstract:** The pathogens of scorch spot disease were isolated from peanut leaves collected in Linshu, Shandong Province and other places. They were identified as *Leptosphaerulina arachidicola* by sequence analysis of genomic ITS region. 3 of 12 Linshu isolates were resistant to carbendazim on PSA medium containing 33.3mg/L carbendazim, while other isolates were susceptible. Carbendazim resistant isolates could grow on PSA medium containing 3 333.3mg/L carbendazim and were also resistant to 30% azoxystrobin, 20% tebuconazole + hey oxime amine, and 70% polyram, but susceptible to 30% tebuconazole, 10% difenoconazole, propiconazole, 25% mancozeb + 8% triazolene and 70% propineb. There was no significant difference in colony diameters between carbendazim resistant and susceptible isolates on PSA medium after 12 days.

**Key words:** Peanut; *Leptosphaerulina arachidicola*; Carbendazim; Fungicide resistance

花生焦斑病是花生上广泛存在的一种病害,在很多国家都有发生<sup>[1~5]</sup>。该病通常产生焦斑和胡麻斑两种类型的症状。其中焦斑类型症状最为常见,通常在叶尖发生,偶尔也在叶缘发生。病斑扩展的边缘有一明亮的黄带,坏死组织变成暗褐色并沿小叶边缘变成碎片,呈被扯碎状。当病原菌不是自叶尖端或边缘侵染而是在叶片中心侵染时,便产生密

密麻麻的小黑点,故名胡麻斑<sup>[5]</sup>。焦斑病和胡麻斑病在田间一般零星发生,是花生的次要病害。

由于花生上叶斑病、网斑病和锈病等叶部病害经常发生在花生的生长后期,因此一般种植区人们习惯性将病害造成的落叶当成是花生成熟的标志,很少进行药剂防治。只有少数花生种植面积大的省份如山东等对花生病害进行防治,通常所用的杀菌

剂为多菌灵<sup>[6]</sup>。该药剂属于苯并咪唑类杀菌剂,通过抑制病原真菌 $\beta$ -微管蛋白的生物合成而影响有丝分裂,具有内吸性和广谱性,被广泛应用于多种病害的防治。由于该药剂作用位点单一,长期使用会诱发田间病原菌突变成抗药性的菌株,导致多菌灵对病害的防效下降。目前已有多种作物的病原菌产生多菌灵抗药性菌株,如小麦赤霉病、水稻恶苗病、油菜菌核病等<sup>[7-10]</sup>。花生褐斑病也有多菌灵抗药性菌株的产生<sup>[11]</sup>,但是其他花生病原菌尚无抗药性菌株的报道。为了考察花生焦斑病病原菌是否存在多菌灵抗性,对进行多菌灵防治的省份和不防治省份的花生焦斑病病原菌分别进行分离,并在室内进行了多菌灵以及其他杀菌剂抑制率的鉴定,为今后合理进行花生病害的药剂防治提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 花生焦斑菌的分离和培养

从山东临沭(花生田常规进行药剂防治)、湖北红安、大悟和江苏泰兴(花生田未进行药剂防治)田间采集表现花生焦斑病症状的叶片,清水冲洗干净,在实验室剪切带有病斑1cm见方的叶片,70%的乙醇消毒5s,转入0.1%次氯酸钠溶液中消毒2min,无菌水清洗3次,置于灭菌滤纸上晾干,剪切病健交界处1~2mm叶片接种于PSA培养基上(马铃薯200g煮沸20min后的滤液,蔗糖20g,琼脂15g,加水至1L),28℃黑暗培养3~7d,挑取菌丝尖端转接到新鲜的PSA培养基上,28℃黑暗培养2周后,观察菌落的形态特征。

### 1.2 焦斑分离物 ITS 间区序列测定和比较

将纯化后的真菌接种于PS(马铃薯蔗糖)液体培养液中,28℃振荡培养,1周后将菌丝利用无菌接种针挑出,菌丝烘干后参照刘少华等的方法<sup>[12]</sup>提取真菌DNA,提取的DNA进行1%琼脂糖凝胶电泳,并利用紫外分光光度计测定其浓度,稀释至20~50ng/ $\mu$ L备用。根据真菌核糖体ITS通用引物ITS1(5'-TCC GTA GGT GAA CCTTGC GG-3')和ITS4(5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')序列合成引物<sup>[13]</sup>。以真菌DNA为模板,扩增反应体系为:2 $\mu$ L 10 $\times$ Taq扩增缓冲液,1U Taq DNA聚合酶,10pmol正向、反向引物各1 $\mu$ L,2mmol/L dNTPs 1 $\mu$ L,补灭菌水至20 $\mu$ L,同时以无菌水作为阴性对照。扩增条件为:94℃变性3min;94℃ 30s,51℃ 30s,72℃ 1min,35个循环;72℃ 7min延伸。扩增产物在1%琼脂糖凝胶上电泳。利用TaKaRa DNA凝胶回收试剂盒回收目的片段,连接入TaKaRa

pMD18-T载体,经鉴定为阳性的克隆送交上海Invitrogen公司进行序列分析。所有菌株测定的序列利用DNASTar Lasergene7.1 MegAlign软件与其他焦斑菌分离物的核苷酸序列进行一致性的比较。

### 1.3 多菌灵敏感性测定

称取一定量的50%多菌灵可湿性粉剂(深圳诺普信农化股份有限公司生产)利用灭菌水配制成1667mg/L的母液(该浓度为多菌灵的田间使用浓度,培养基测定浓度为该浓度的1/50,即33mg/L),待融化后的PSA培养基温度为50~60℃时,取多菌灵母液1.2mL加入58.8mL的培养基中,充分混匀后倒入灭菌培养皿,得到多菌灵浓度为33mg/L的含药平板;取等量的灭菌水加入PSA培养基中得到对照培养平板。将所有焦斑分离物新鲜的菌碟接入含药平板和对照平板的中央,每个处理3皿,3次重复,28℃黑暗培养2周后,十字交叉法测量菌落的直径,计算多菌灵对焦斑病菌菌丝生长的抑菌率。

### 1.4 抗药性浓度测定

按照1.3的方法分别配制多菌灵浓度为33、167、333、833、1667和3333mg/L的含药培养平板和对照平板。将焦斑菌临沭多菌灵抗性分离物菌碟分别接入平板中央,每个浓度3个皿,3次重复,28℃黑暗培养2周,同1.3测量菌落的直径。

### 1.5 不同分离物的生长曲线

利用无菌打孔器分别将保存于PSA培养基上的花生焦斑菌山东临沭抗多菌灵分离物、江苏泰兴、湖北大悟和紅安分离物进行取样,0.6mm的菌碟接种于新鲜的PSA培养基上,每个分离物分别接种3个皿,3次重复,28℃黑暗培养,每2d利用十字交叉法测量菌落的直径,一共测量12d的菌落直径,绘制不同分离物的生长曲线。

### 1.6 多菌灵抗性分离物对其他杀菌剂的敏感性测定

将杀菌剂70%丙森锌可湿性粉剂(商品名喜多生,台湾兴农股份有限公司生产)、70%代森联水分散粒剂(商品名品润,法国巴斯夫公司生产)、10%苯醚甲环唑水分散粒剂[商品名世高,先正达(中国)投资股份有限公司生产]、30%戊唑醇悬浮剂(商品名金库,江苏徐州润泽化工有限公司生产)、25%代森锰锌+8%三唑酮可湿性粉剂(商品名锰锌·唑酮,山东亿嘉农化集团生产)、丙环唑乳油(商品名娇美,山东亿嘉农化集团生产)、30%啉菌酯悬浮剂(商品名华星百美,安徽华星化工股份公司生产)、20%戊唑醇+烯肟菌胺悬浮剂(商品名爱可,沈阳科创化学品股份有限公司生产),利用灭菌

水配制推荐田间使用浓度 10 倍的母液,将 PSA 琼脂融化后凉至 50 ~ 60℃,加入不同杀菌剂的母液,配制含药 PSA 培养基平板,使终浓度为这些药剂的推荐田间使用浓度,分别为 200、1 666、1 500、1 000、400、666、400 和 500mg/L。将山东临沭抗性分离物新鲜菌碟分别接种到这些含药平板中央,每种药剂 3 次重复,28℃ 黑暗培养 2 周后,同 1.3 测量菌落的直径,观察菌丝的生长情况。

### 1.7 统计分析

采用 Microsoft Excel 2010 和 SPSS 11.5 软件,统计与分析花生焦斑菌不同分离物在 PSA 培养基上菌落的直径和不同分离物在含药剂培养基上菌落的直径的数据,并进行方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 花生焦斑菌形态特征

在 PSA 培养基上,焦斑病的病原菌菌丝生长缓慢,菌落呈灰白色或灰黑色,菌落表面干燥,近圆形,背面黑色,无可溶性色素分泌到培养基中;菌丝绒毛状,边缘白色、深绿色或暗褐色,具隔分枝,14d 后菌落直径为 70mm 左右(图 1)。

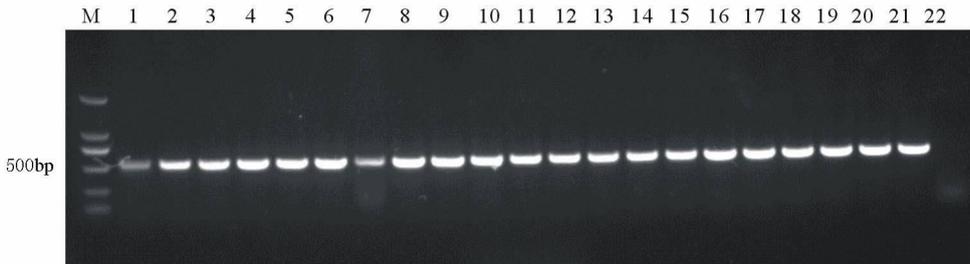


图 1 PDA 培养基上的花生焦斑病菌

Fig.1 *Leptosphaerulina arachidicola* isolate on PDA medium

### 2.2 焦斑菌分离物 ITS 区序列比较

利用 ITS1 和 ITS4 引物分别扩增不同焦斑病菌的分离物。在 1% 琼脂糖凝胶上,这些分离物的扩增片段大小一致,均为 500bp 左右(图 2)。连接至 pMDT-18 载体上的阳性克隆经测序后均得到 540bp 的核苷酸序列,经 DNASTar Lasergene7.1 MegAlign 软件分析,这些分离物的序列完全一致,并且与 NCBI 登录的落花生小光壳菌(*Leptosphaerulina*



注:M:DL2000;1-12:临沭分离物;13-15:红安分离物;16-19:大悟分离物;19-21:泰兴分离物;22:水对照

Note:M:DL2000;1-12:Liushu isolates;13-15:Hongan isolates;16-19:Dawu isolates;19-21:Taixing isolates;22:water control

图 2 不同地方的焦斑菌分离物 ITS 区的 PCR 扩增

Fig.2 PCR fragment of ITS region of different *Leptosphaerulina arachidicola* isolates

*arachidicola*) 的序列具有 100% 的相似度。山东临沭焦斑菌 Linshu1 的序列登录号为 KJ612070。

### 2.3 焦斑分离物对多菌灵的敏感性测定

在含有 33mg/L 多菌灵的 PSA 培养基,28℃ 条件下黑暗培养 12d 后,大悟、红安和泰兴等地获得的分离物菌丝几乎不生长,接种块上菌丝变黑;而 12 株山东临沭分离物中有 3 株生长良好,与无药对照平板上菌丝的直径相近,对照无药平板菌落直径为 76mm,在 33mg/L 多菌灵平板上菌落直径为 70mm 左右。

### 2.4 不同浓度多菌灵对焦斑病菌菌丝生长的影响

取这 3 株抗多菌灵的山东临沭焦斑菌分离物菌丝块放置在含有不同浓度多菌灵的 PSA 培养基平板上。2 周后这些菌株都有不同程度的生长,方差

分析表明,在多菌灵浓度为 33 ~ 1 667mg/L 培养基上,菌落直径之间不存在显著性差异,但是与不含杀菌剂平板及含 3 333mg/L 多菌灵的平板上的菌落直径存在显著差异。33 ~ 1 667mg/L 的多菌灵对抗药性菌的抑制效果相近,抑制率均低于 15%。在 3 333mg/L 的高浓度下(相当于田间喷施浓度的 2 倍),菌丝仍能生长良好,在此浓度下,多菌灵对抗性菌的抑制率为 45.5%(表 1)。

### 2.5 花生焦斑菌生长曲线

花生焦斑菌山东临沭多菌灵抗性分离物、江苏泰兴、湖北红安和大悟分离物在 PSA 培养基上 28℃ 下 12d 内近乎直线生长。临沭、红安、泰兴和大悟分离物平均生长速率为 5.68、5.43、5.82 和 5.35mm/d

(图3),方差分析表明,临沭抗性分离物、红安和泰兴分离物生长速率不存在显著性差异,但与大悟分离物的生长速率存在显著性差异。

表1 不同浓度的多菌灵对临沭焦斑病分离物的抑制作用

Table 1 Suppression of *Leptosphaerulina arachidicola* Linshu isolate by carbendazim under different concentrations

多菌灵浓度 Con. of carbendazim /(mg/L)	菌落的直径 Colony diameter /cm	抑制率 Inhibition ratio /%
CK	7.68 ± 0.33a	0
33	6.92 ± 0.13b	10.4
167	6.78 ± 0.06bc	12.9
333	7.00 ± 0.10b	9.4
833	6.85 ± 0.0b	11.5
1 667	6.52 ± 0.10c	14.2
3 333	4.32 ± 0.18d	45.5

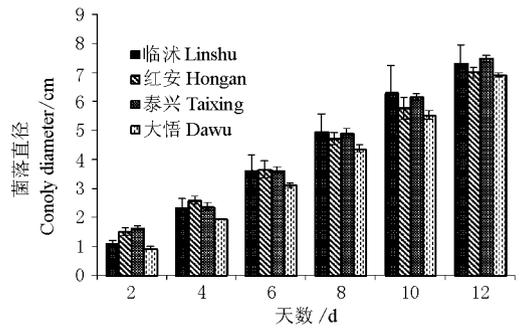
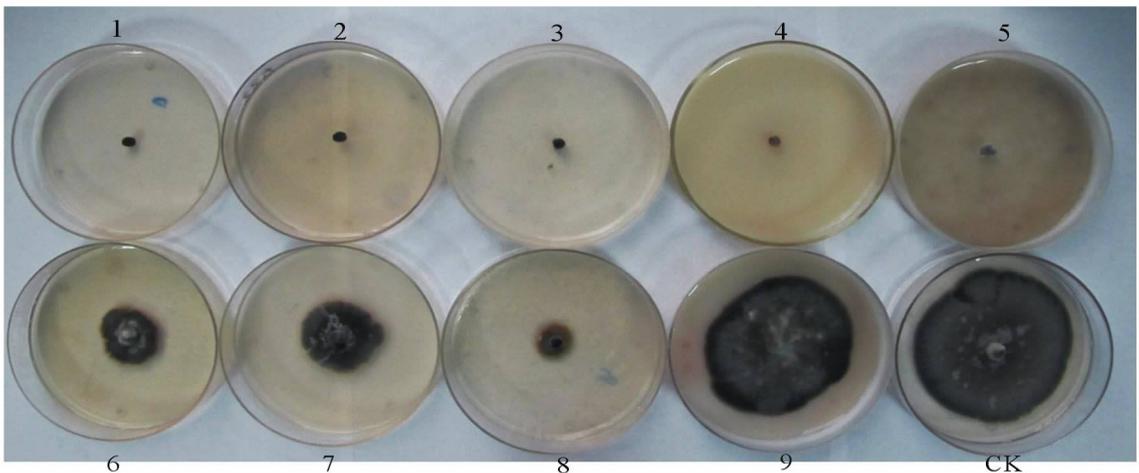


图3 不同焦斑病菌分离物在PSA培养基上不同天数菌落的直径

Fig.3 Colony diameter of different *Leptosphaerulina arachidicola* isolates on PSA

## 2.6 多菌灵抗性分离物对其他杀菌剂的敏感性

8种其他杀菌剂对抗多菌灵焦斑菌临沭分离物菌丝的生长存在不同程度的抑制作用。70%丙森



注:1:25%代森锰锌+8%三唑酮可湿性粉剂;2:30%戊唑醇悬浮剂;3:三环唑乳油;4:70%丙森锌可湿性粉剂;

5:10%苯醚甲环唑水分散粒剂;6:20%戊唑醇+烯肟菌胺悬浮剂;7:30%啞菌酯悬浮剂;8:70%代森联水分散粒剂;9:33mg/L多菌灵;10:对照

Note:1:25% mancozeb + 8% triazole;2:30% tebuconazole;3:propiconazole;4:70% propineb;5:10% difenoconazole;

6:20% tebuconazole + hey oxime amine and polyram;7:30% azoxystobin;8:70% polyram;9:33mg/L carbendazim;10:ck

图4 8种杀菌剂对临沭多菌灵抗性分离物菌丝生长的抑制作用

Fig.4 Suppression of mycelial growth of *Leptosphaerulina arachidicola* Linshu isolate by 8 fungicides

锌可湿性粉剂、30%戊唑醇悬浮剂、25%代森锰锌+8%三唑酮可湿性粉剂、10%苯醚甲环唑水分散粒剂和三环唑乳油完全抑制了该分离物菌丝的生长,菌丝块上的菌丝发黑,没有生长,抑制率达100%。70%代森联水分散剂对菌丝的抑制作用较强,菌落周围有褐黄色晕圈,菌丝生长缓慢,抑制率为82.9%;20%戊唑醇+烯肟菌胺悬浮剂对菌丝生长的抑制率达58.6%;30%啞菌酯悬浮剂对该分离物菌丝生长的抑制率为49.8%(图4)。

## 3 小结与讨论

早在20世纪70年代,多菌灵已经在我国生产和应用<sup>[14,15]</sup>,到目前已经有40多年的历史。由于其为广谱内吸性杀菌剂,可防治多种植物病害,在生

产上广泛应用<sup>[14]</sup>,但因作用位点单一,田间连续使用多年后,防效因抗药性的产生而显著下降<sup>[7-10,16]</sup>。

由于花生在我国是小作物,农民较少对其进行化学防治,只在种植大省如山东省比较重视花生病害的化学防治,多菌灵是防治花生病害的重要药剂之一。20世纪90年代一些研究者发现花生叶斑病原产生了多菌灵抗药性<sup>[11]</sup>,但是花生其它病害的病原是否存在多菌灵抗药性,目前尚未见报道。

本试验从经常进行花生叶部病害防治的山东省和其他不进行药剂防治的省份分离得到21个花生焦斑病分离物,在含多菌灵的平板上,发现经常施用多菌灵的山东省临沭的焦斑病部分分离物对多菌灵存在抗药性,而其他的分离物表现对多菌灵敏感。利用含33mg/L多菌灵的PSA平板对不同地方来源

的 21 个花生焦斑分离物进行抗药性测定的时候,发现该浓度的多菌灵对其他 3 个地方 9 个分离物均具有抑制作用,菌丝块发黑,菌丝不生长;但 12 个临沭分离物中有 3 个生长良好,与对照未施药平板上菌落生长差别不大,抗药性比例达 25%,与杨叶等报道海南芒果炭疽菌对多菌灵的抗性比例为 21.7% 类似<sup>[17]</sup>。刘勇等虽然建立了花生褐斑病菌对多菌灵的抗药性的测试方法,但是未报道抗性菌株所占的比例和抗药性的强度<sup>[11]</sup>。杨叶等报道的芒果炭疽病菌能在含 1 200 μg/ml 多菌灵的 PDA 上生长良好<sup>[17]</sup>;詹儒林等报道芒果炭疽病抗性菌株在 500 μg/ml 多菌灵下生长良好<sup>[18]</sup>;与这些抗性菌株相比,我们分离得到的焦斑病的病原菌对多菌灵的抗药性更强,在含多菌灵为 3 333 mg/L 的 PSA 培养基上还能生长,菌落直径接近对照菌菌落的 1/2 左右,表明临沭焦斑抗性分离物对多菌灵具有高度的抗药性,这种高抗多菌灵菌株的存在会降低多菌灵的田间防治效果。

将多菌灵抗药性临沭分离物与多菌灵敏感的江苏泰兴、湖北红安和大悟分离物菌落的生长速率进行比较,发现临沭抗性分离物菌落的生长曲线呈直线。方差分析表明,其在培养基上的菌落直径与敏感的江苏泰兴和湖北红安、大悟分离物除在初始阶段存在显著性差异,后期不存在显著性差异,表明抗多菌灵的临沭分离物在田间能形成优势菌群的潜在威胁,会导致多菌灵施用的防治效果降低。

抗多菌灵临沭分离物对其他 8 种杀菌剂敏感性存在差异,在 20% 戊唑醇 + 烯肟菌胺、30% 嘧菌酯和 70% 代森联的平板上,菌丝能生长,但对另外 5 种杀菌剂(70% 丙森锌可湿性粉剂、30% 戊唑醇悬浮剂、25% 代森锰锌 + 8% 三唑酮可湿性粉剂和丙环唑乳油)敏感,菌丝发黑,不生长。这与詹儒林等报道,芒果炭疽病菌对甲基硫菌灵、苯菌灵、咯菌灵表现正交互抗性,而对乙霉威和咪鲜胺敏感类似<sup>[18]</sup>。因此在常年施用多菌灵的花生种植区,由于长期使用相同的药剂,导致病原菌产生了抗药性。但是这些病原菌对一些药剂存在抗药性的同时,对其他一些药剂仍然敏感,因此进行药剂选择时,应选择菌株敏感的杀菌剂进行使用,并且最好是不同杀菌剂交替施用,延缓抗药性病原菌的产生。

## 参考文献:

[1] Luttrell B S, Boyle L W. Leaf spot of peanut in Georgia caused by *Leptosphaerulina arachidicola* [J]. Plant Disease Reporter, 1960, 44(8): 609 - 611.

- [2] Suryanarayanan T S, Murali T S. Incidence of *Leptosphaerulina crassiasca* in symptomless leaves of peanut in southern India [J]. Journal of Basic Microbiology, 2006, 46(4): 305 - 309.
- [3] Mallaiah, K V, Sreeramulu T. Aerobiology of *Leptosphaerulina crassiasca* causing pepper spot disease of groundnut [J]. Indian Journal of Agriculture Sciences, 1976, 46: 372 - 378.
- [4] Sharma P S, Rao B P, Rao G V R. First report of pepper spot and leaf scorch on groundnut in Nepal [J]. International Arachis Newsletter, 1993, 13: 8 - 9.
- [5] 廖伯寿. 花生主要病虫害识别手册 [M]. 武汉: 湖北科技出版社, 2012. 14 - 15.
- [6] 朱宗堂, 范常胜. 花生叶斑病的发生规律和防治研究总结 [J]. 山东农业科学, 1982, 3: 44 - 45.
- [7] 顾宝根, 刘经芬. 小麦赤霉病对多菌灵抗药性测定方法的探讨 [J]. 植物保护学报, 1990, 17(3): 275 - 278.
- [8] 王建新, 周明国. 小麦赤霉病菌对多菌灵抗药性检测技术研究 [J]. 植物保护学报, 2002, 29(1): 73 - 77.
- [9] 何富刚, 颜范悦, 辛万民, 等. 水稻恶苗病菌抗药性的产生及防除 [J]. 辽宁农业科学, 1994, 3: 12 - 14.
- [10] 石志琦, 周明国, 叶钟音, 等. 油菜菌核病菌对多菌灵的抗药性监测 [J]. 江苏农业科学, 2000, 16(4): 226 - 229.
- [11] 刘勇, 叶钟音, 刘经芬, 等. 花生褐斑病对多菌灵抗药性测试方法的研究 [J]. 中国油料, 1991(4): 67 - 70.
- [12] 刘少华, 陆金萍, 朱瑞良, 等. 一种快速简便的植物病原真菌基因组 DNA 提取方法 [J]. 植物病理学报, 2005, 35(4): 362 - 365.
- [13] White T J, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [A]. Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, et al. PCR protocols: A guide to methods and applications [M]. New York: Academic Press Inc, 1990. 315 - 322.
- [14] 沈阳化工研究院. 内吸杀菌剂多菌灵的合成研究 [J]. 辽宁化工技术通讯, 1973(4): 29 - 33.
- [15] 中国农业科学院柑桔研究所储藏小组. 控制柑桔果实绿、青霉病的高效杀菌剂多菌灵 [J]. 柑桔科技通讯, 1974(3): 13 - 22.
- [16] 顾春波, 史晓斌, 姜莉莉, 等. 草莓枯萎病菌对多菌灵的抗性及其抗性菌株生物学特性 [J]. 植物病理学报, 2010, 37(3): 266 - 272.
- [17] 杨叶, 何书海, 张淑娟, 等. 海南芒果炭疽菌对多菌灵的抗药性测定 [J]. 热带作物学报, 2008, 29(1): 73 - 77.
- [18] 詹儒林, 李伟, 郑服丛. 芒果炭疽病菌对多菌灵的抗药性 [J]. 植物保护学报, 2005, 32(1): 71 - 76.