

潘夏艳,朱 凤,周 晨,等. 2020—2021 年江苏省稻曲病菌对三唑类杀菌剂的抗药性监测[J]. 江苏农业科学,2023,51(5):134–138.
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2023.05.018

2020—2021 年江苏省稻曲病菌对三唑类杀菌剂的抗药性监测

潘夏艳¹, 朱 凤², 周 晨², 于俊杰¹, 俞咪娜¹, 宋天巧¹, 曹慧娟¹, 刘永锋¹

(1. 江苏省农业科学院植物保护研究所, 江苏南京 210014; 2. 江苏省植物保护植物检疫站, 江苏南京 210014)

摘要:前期研究发现江苏省稻曲病菌对三唑类杀菌剂存在抗药性风险,为进一步明确江苏省稻曲病菌对三唑类杀菌剂的抗药性发展规律,指导全省三唑类杀菌剂的科学使用,利用菌丝生长速率法,测定了 2020 年江苏省 6 个地区和 2021 年江苏省 7 个地区共计 219 个稻曲病菌单孢菌株对三唑类杀菌剂的敏感性,并通过测定抗性菌株的生长速率和对水稻的致病力对其适合度进行了分析。结果表明,2020 年采集的 84 株稻曲病菌对丙环唑均敏感;2021 年,在靖江市监测到 1 株抗药性菌株,该市抗性频率为 6.7%,全省抗性频率为 0.7%;抗性水平 2.2 倍。进一步对筛选到的稻曲病菌抗药性菌株适合分析发现,抗药性菌株生长和致病力与敏感菌株相比均无显著差异,表明在三唑类杀菌剂的田间选择压下,抗药性可能会进一步发展。本研究明确了江苏省稻曲病菌对三唑类杀菌剂存在低抗药性风险,目前在做好抗药性监测的前提下,三唑类杀菌剂可继续作为江苏省防治稻曲病的主要药剂。

关键词:稻曲病菌;三唑类杀菌剂;抗药性;适合度

中图分类号:S482.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002–1302(2023)05–0134–05

稻曲病是由稻曲病菌(*Ustilaginoidea virens*, 有性态 *Villosiclava virens*) 侵染水稻穗部引起的一种世界性真菌病害^[1–2]。稻曲病不仅造成水稻严重减产,而且稻曲病菌分泌的毒素会对人畜造成一定的毒害作用^[3–5]。近年来由于杂交水稻品种的推广种植、化学肥料的过度使用等因素,我国水稻种植区稻曲病危害不断加重,严重威胁我国粮食安全^[6–9]。利用三唑类杀菌剂对稻曲病进行综合防控是当下控制该病害流行的重要措施^[10–12]。然而,随着三唑类杀菌剂长期、广泛被使用,笔者所在课题组自 2015 年起已在江苏省多地监测到稻曲病菌对三唑类杀菌剂的田间抗药性菌株,且具有较高的适合度,表明江苏省稻曲病菌对三唑类杀菌剂存在抗药性风险^[13–15]。为进一步明确江苏省稻曲病菌对三唑类杀菌剂的抗药性发生分布范围和抗药性发展规律,本研究连续 2 年监测了江苏省稻曲病菌对三唑类杀菌剂的抗药性,评估了三唑类杀菌剂防治稻曲病的抗性风险,以期在生产上三唑类杀菌剂的科

学使用及抗药性治理策略的制定提供理论指导依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试药剂和菌株 丙环唑原药由南京农业大学提供,用甲醇配成 10 g/L 的母液,于 4 ℃ 冰箱贮存,备用。

2020 年供试菌株为 84 株。由各地植保站采自江苏省徐州市、扬州市仪征市、南京市、南通市、泰州市靖江市和盐城市东台市 6 个地区,采样水稻品种为南粳 5055、南粳 9108、金粳 818、徽两优丝苗、春优 301、隆两优 1686、深两优 5814 和淮稻 5 号等 12 个水稻品种。具体采样情况如表 1 所示。2021 年供试菌株共计 135 株。由各地植保站采自江苏省徐州市、南京市、淮安市、连云港市、盐城市东台市、南通市和泰州市靖江市 7 个地区,采样水稻品种为南粳系、荃优系、徐稻系、金陵香粳、金香玉 1 号、盐粳 7 号、淮稻 5 号等 20 多个水稻品种。具体采样情况如表 2 所示。

1.2 试验方法

1.2.1 稻曲病菌单孢菌株的分离 用灭菌手术刀将稻曲球对半切开,无菌牙签挑取稻曲球中部白色菌丝块于含 50 mg/L 卡那霉素的马铃薯蔗糖琼脂培养基(PSA: 1 L 中含 200 g 马铃薯煮沸过滤液、20 g

收稿日期:2022–11–30

基金项目:国家自然科学基金(编号:32001943)。

作者简介:潘夏艳(1990—),女,江苏常熟人,博士,助理研究员,研究方向为植物病害防控。E-mail:panxy@jaas.ac.cn。

通信作者:刘永锋,博士,研究员,研究方向为水稻病害病原致病机制及绿色防控技术。E-mail:liuyf@jaas.ac.cn。

表 1 2020 年稻曲病菌的采集与分离情况

菌株编号	水稻品种	采集地	用药情况	分离株数
2020-1~5	徽两优丝苗	徐州市睢宁县濉河街道兴华社区	30% 苯甲丙环唑 20 g	5
2020-6~10	春优 301	徐州市睢宁县金城街道小鲍村	30% 苯甲丙环唑 20 g	5
2020-11~15	金粳 818	徐州市睢宁县高作镇金塘村	30% 苯甲丙环唑 20 g	5
2020-16~20	隆两优 1686	徐州市睢宁县沙集镇丁陈村	30% 苯甲丙环唑 20 g	5
2020-21~30	—	仪征市植保站	—	10
2020-31~35	南粳 5055	南京市浦口区农机中心植保站永宁街道大桥社区	井冈霉素、氟环唑	5
2020-36~40	深两优 5814	南京市浦口区星甸街道王村	井冈霉素、氟环唑	5
2020-41~44	南粳 5055	南通市通州区金沙镇金北村	井冈霉素、氟环唑	4
2020-45~48	南粳 5055	南通市通州区兴仁镇横港居	吡唑啉菌酯	4
2020-49~52	南粳 9108	南通市通州区兴仁镇戚家桥村	啉菌酯	4
2020-53~56	南粳 9108	南通市通州区金沙镇金北村	啉菌酯	4
2020-57~62	南粳 5055	靖江市新桥镇太东村	苯甲丙环唑	6
2020-63~68	南粳 5055	靖江市靖城街道柏木村	苯甲丙环唑	6
2020-69~74	金粳 818	东台市时堰镇倪黄村	苯甲丙环唑	6
2020-75	淮稻 5 号	东台市东台镇宴溪和社区	苯甲丙环唑	1
2020-76	淮稻 6 号	东台市东台镇宴溪和社区	苯甲丙环唑	1
2020-77	淮稻 7 号	东台市东台镇宴溪和社区	苯甲丙环唑	1
2020-78	淮稻 8 号	东台市东台镇宴溪和社区	苯甲丙环唑	1
2020-79	淮稻 9 号	东台市东台镇宴溪和社区	苯甲丙环唑	1
2020-80~84	南粳 9108	东台市富安镇梁一村	20% 井冈霉素	5
合计				84

注：“—”表示情况不详,表 2 同。

表 2 2021 年稻曲病菌的采集与分离情况

菌株编号	水稻品种	采集地	用药情况	分离株数
2021-1	南粳 5718	徐州市睢宁县梁集大沙村	噻呋酰胺、苯甲丙环唑、井冈霉素	1
2021-2~6	南粳 5719~5723	徐州市睢宁县濉河街道兴华社区	噻呋酰胺、苯甲丙环唑、井冈霉素	5
2021-7~12	荃优 169~174	徐州市睢宁县庆安镇杜本村	苯甲丙环唑	6
2021-13	徽两优 348	徐州市睢宁县魏集镇马五村	苯醚甲环唑、丙环唑、啉菌酯、戊唑醇	1
2021-14~15	徽两优 349~350	徐州市睢宁县高作镇金塘村	苯醚甲环唑、丙环唑、啉菌酯、戊唑醇	2
2021-16~18	徽两优 351~353	徐州市睢宁县沙集镇丁陈村	苯醚甲环唑、丙环唑、啉菌酯、戊唑醇	3
2021-19~24	徐稻 10~15	徐州市睢宁县濉河街道	苯醚甲环唑	6
2021-25~34	—	南京市江宁区淳化街道港东村	—	10
2021-35~44	—	南京市江宁区淳化街道周子村	—	10
2021-45~50	金陵香粳	淮安市洪泽区油田农场	三环唑、苯甲啉菌酯、丙环啉菌酯	6
2021-51~55	五香粳 113	淮安市洪泽区岔河镇滨河村	三环唑、苯甲啉菌酯、丙环啉菌酯	5
2021-56~60	南粳 9108	淮安市洪泽区岔河镇滨河村	三环唑、苯甲啉菌酯、丙环啉菌酯	5
2021-61~65	金香玉 1 号	淮安市洪泽区高良涧街道王庄村	三环唑、苯甲啉菌酯、丙环啉菌酯	5
2021-66~70	南粳 5718	连云港市灌南县新集镇菊花村	井冈霉素、戊唑醇	5
2021-71~75	盐粳 7 号	连云港市灌南县百六镇百六村	井冈霉素、戊唑醇	5
2021-76~80	嘉优中科 1 号	连云港市灌南县新安镇新安村	井冈霉素、戊唑醇	5
2021-81~85	连粳 1 号	连云港市灌南县李集镇	井冈霉素、苯甲丙环唑	5
2021-86~90	南粳 9108	东台市东台镇宴溪社区	24% 井冈霉素	5
2021-91~95	金粳 818	东台市南沈灶镇安三村	苯甲丙环唑	5
2021-96~100	淮稻 5 号	东台市富安镇竹林村	苯甲丙环唑	5
2021-101~105	南粳 5718	东台市东台镇蟒河村	24% 井冈霉素	5
2021-106~120	金香玉 1 号	南通市如东县马塘镇马南村	—	15
2021-121~130	南粳 46	靖江市孤山镇新联村	三环唑、肟菌戊唑醇	10
2021-131~135	南粳 5055~5059	靖江市孤山镇勤丰村	三环唑、肟菌戊唑醇	5
合计				135

蔗糖和 15 g 琼脂粉)平板上,于 28 ℃ 培养 3 ~ 5 d。挑取菌丝块于含 50 mg/L 卡那霉素的 PSB 培养液中,28 ℃、150 r/min 摇培 5 d 后,吸取孢子液显微观察产孢情况并将孢子液调至浓度为 1.0×10^4 个/mL,取 1 μ L 上述孢子液于 100 μ L 无菌水中混匀后涂布于 PSA 平板上,28 ℃ 培养 5 d,单个孢子萌发形成的菌落即为稻曲病菌单孢菌株,保存于试管中备用。

1.2.2 稻曲病菌抗药性菌株的筛选 综合分析笔者所在研究室 2018 年建立的江苏省稻曲病菌对丙环唑的敏感性基线^[4]和测定的田间稻曲病菌敏感菌株对丙环唑最小抑制浓度(MIC)0.5 mg/L,本研究将 1.0 mg/L 作为稻曲病菌对丙环唑田间抗药性监测标准,即能在 1.0 mg/L 丙环唑含药 PSA 平板上生长的菌株定为丙环唑的抗药性菌株,不能在含 1.0 mg/L 丙环唑含药 PSA 平板上生长的菌株定为丙环唑敏感菌株。将供试菌株在 28 ℃ 培养箱倒置预培养 15 d,制成 5 mm 的菌碟后接种于含 1.0 mg/L 丙环唑含药 PSA 平板中央,28 ℃ 倒置培养 20 d,观察菌株生长情况。每个处理重复 3 次。

1.2.3 稻曲病菌对三唑类杀菌剂的敏感性测定 采用菌丝生长速率法测定稻曲病菌对三唑类杀菌剂的敏感性^[16],具体步骤如下:将供试菌株于 28 ℃ 培养箱倒置培养 15 d,取直径 5 mm 菌龄一致的菌碟转移至含系列浓度梯度的丙环唑 PSA 平板(直径为 6 cm)中央,甲醇为阴性对照,丙环唑浓度梯度设置为 0.019 5、0.078 1、0.312 5、1.25、5 mg/L。每个浓度梯度 3 个重复,倒置于 28 ℃ 恒温培养箱培养,20 d 后测量供试菌株在不同浓度含药培养基上的菌落直径,并用 DPS 软件计算丙环唑对各供试菌株的抑制中浓度 EC_{50} 值。本试验重复 3 次

1.2.4 抗性水平划分 按照以下公式计算三唑类杀菌剂的抗性频率和抗性水平。

抗性频率 = (抗药性菌株数/总菌株数) $\times 100\%$;

抗性水平 = 供试稻曲病菌 EC_{50} /平均 EC_{50} 值 (平均 EC_{50} 值为 2018 年本研究室建立的敏感性基线 0.05 mg/L)。

当抗性水平 ≤ 1 时,该菌株为敏感菌株,当抗性水平 > 1 且 ≤ 5 时,该菌株为低抗菌株,当抗性水平 > 5 且 ≤ 10 为中抗菌株,当抗性水平 > 10 时,该菌株为高抗菌株。

1.2.5 抗药性菌株适合度分析 (1) 生长速率测定:将供试菌株于 28 ℃ 培养箱倒置培养 15 d,取直径 5 mm 的菌碟于 PSA 平板中央,倒置于 28 ℃ 培养

箱倒置培养 15 d 后测量菌落直径并拍照,SPSS 软件进行统计分析。每个处理 3 个重复,本试验重复 2 次。(2) 致病力测定:参照俞咪娜等的方法^[17]稍作修改,取新鲜的供试菌株的菌碟于 PSB 培养液中于 28 ℃、150 r/min 摇培 5 d 后,显微观察孢子浓度并调至 1.0×10^6 个/mL,然后将菌丝块和孢子液一起打碎作为接种体,注射器接种 1 mL 接种体至破口前 5 ~ 7 d 的两优培九穗苞中,每个菌株接种 10 穗,接种 30 d 后调查每穗稻曲球数并拍照,SPSS 软件进行统计分析。本试验重复 2 次。

2 结果与分析

2.1 江苏省稻曲病菌对三唑类杀菌剂的抗药性监测

本研究共分离获得 2020 年来自江苏省 6 个地区的稻曲病菌单孢菌株 84 株,2021 年来自江苏省 7 个地区的稻曲病菌单孢菌株 135 株,总计 219 株。对其抗药性监测结果表明:2020 年所有菌株均为敏感菌株,2021 年靖江市有 1 株菌株能在 1.0 mg/L 含丙环唑的平板上生长,为稻曲病菌对丙环唑的田间抗药性菌株,江苏省稻曲病菌对丙环唑的抗性频率为 0.7%,靖江市抗性频率为 6.7%(表 3)。

2.2 稻曲病菌对三唑类杀菌剂敏感性测定和抗性水平分析

对筛选获得的稻曲病菌抗药性菌株 2021-128 进行了丙环唑敏感性测定(图 1),得出 2021-128 对丙环唑的 EC_{50} 值为 0.11 mg/L,抗性水平为 2.2 倍,为低抗菌株。

2.3 稻曲病菌抗性菌株适合度分析

对稻曲病菌抗药性菌株生长速率和致病力测定发现,抗药性菌株 2021-128 与敏感菌株 2021-30 相比,生长速率(图 2-A、图 2-B)和致病力(图 2-C、图 2-D)均无显著差异,表明该抗药性菌株田间适合度没有降低。

3 讨论

稻曲病主要依赖于化学药剂防控,防治关键时期为水稻穗期,即破口前 5 ~ 7 d 施用丙环唑、戊唑醇等三唑类杀菌剂和井冈霉素为主^[18-21]。在其他粮食作物和经济作物病害病原菌中,三唑类杀菌剂的抗性屡见报道,如小麦褐锈菌(*Puccinia tritricina*)、柑橘绿霉病菌(*Penicillium digitatum*)、瓜类白粉病菌(*Sphaerotheca fuliginea*)、大麦白粉病菌(*Blumeria*

表 3 2020—2021 年江苏省各地区稻曲病菌对三唑类杀菌剂抗性菌株监测及抗性频率

地区	2020 年			2021 年		
	分离菌株数	抗性菌株数	抗性频率	分离菌株数	抗性菌株数	抗性频率
南京	10	0	0	20	0	0
南通	16	0	0	15	0	0
靖江	12	0	0	15	1	6.7%
东台	16	0	0	20	0	0
徐州	20	0	0	24	0	0
淮安	0	0	0	21	0	0
连云港	0	0	0	20	0	0
仪征	10	0	0	0	0	0
合计	84	0	0	135	1	0.7%

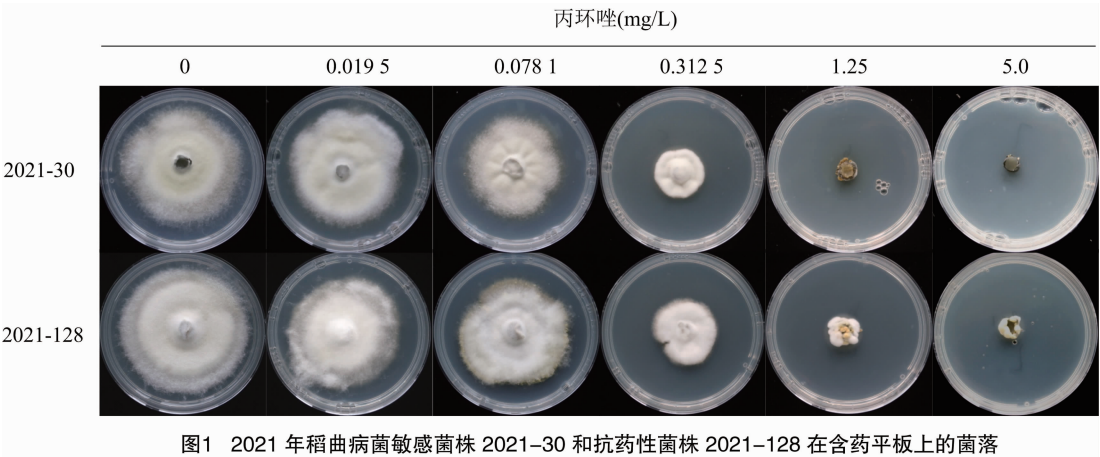


图1 2021 年稻曲病菌敏感菌株 2021-30 和抗药性菌株 2021-128 在含药平板上的菌落

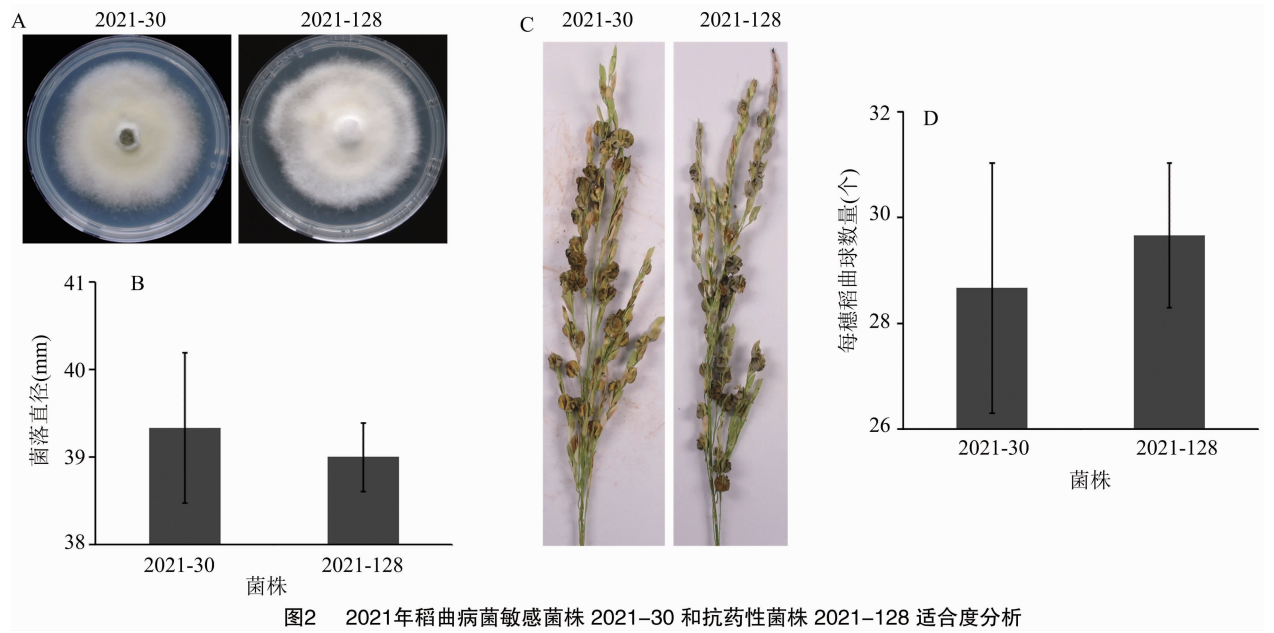


图2 2021年稻曲病菌敏感菌株 2021-30 和抗药性菌株 2021-128 适合度分析

graminis f. sp. *hordei*) 等都对三唑类杀菌剂产生了不同程度的抗药性^[22-24]。王菲等人曾通过室内紫外诱变的方法,成功获得稻曲病菌对戊唑醇的抗药性菌株^[25]。笔者所在研究室通过对稻曲病菌对三

唑类杀菌剂多年的田间抗药性监测,于 2015 年在江苏省淮安市首次监测到 2 株稻曲病菌对丙环唑的田间抗药性菌株^[13],2017 年在江苏省徐州市、淮安市和常州市金坛区以及 2019 年在江苏淮安市、徐州

市、常州市金坛区和连云港市多地均监测到稻曲病菌对丙环唑田间抗药性菌株,且部分抗药性菌株田间适合度高,表明稻曲病菌对三唑类杀菌剂可能存在抗药性风险^[14-15]。因此,探明江苏省稻曲病菌对三唑类杀菌剂的抗药性病原群体发生发展规律,对指导科学使用三唑类杀菌剂、高效防控稻曲病具有重要意义。

本研究继续监测了 2020—2021 年江苏省田间稻曲病菌对三唑类杀菌剂的敏感性,结果表明 2020 年江苏省各地区未监测到田间抗药性菌株;2021 年于江苏省靖江市监测到 1 株田间抗药性菌株,抗性频率低,且为低抗药性菌株。这表明稻曲病菌对三唑类杀菌剂的田间抗药性发展较慢,目前还没有呈动态上升发展趋势。但是 2021 年监测到的抗药性菌株适合度较高,在田间三唑类杀菌剂选择压力下,田间抗性可能会发展较快。此外,值得注意的是,较往年,靖江市为新增监测到田间抗药性菌株的地区。从 2015 年至今,稻曲病菌对三唑类杀菌剂的抗药性发生范围已从淮安市扩展到徐州市、常州市金坛区、连云港市以及泰州市靖江市,主要集中在苏北地区。综上,尽管稻曲病菌对三唑类杀菌剂抗药性发展缓慢,但介于抗药性菌株的田间适合度和扩展范围,仍需加强我省稻曲病菌对三唑类杀菌剂的抗药性监测,了解抗药性病原群体变化动态,及时采取不同的抗药性治理策略,延缓抗药性的发生发展,从而延长三唑类杀菌剂在我省稻曲病防控中的使用寿命。

参考文献:

- [1] Ou S H. Rice Disease [R]. London: Common Wealth Mycological Institute, 1972: 288 - 295.
- [2] Tanaka E, Ashizawa T, Sonoda R, et al. *Villosiclava virens* gen. nov., comb. nov., the teleomorph of *Ustilaginoida virens*, the causal agent of rice false smut [J]. Mycotaxon, 2008, 106: 491 - 501.
- [3] 曹奎荣, 钟雪明, 陈 婕, 等. 稻曲病对水稻产量和品质的影响 [J]. 浙江农业科学, 2018, 59(10): 1868 - 1870.
- [4] Li P X, Evans C D, Wu Y Z, et al. Evolution of the total syntheses of ustiloxin natural products and their analogues [J]. Journal of the American Chemical Society, 2008, 130(7): 2351 - 2364.
- [5] Luduena R F, Roach M C, Prasad V, et al. Interaction of ustiloxin - A with bovine brain tubulin [J]. Biochemical Pharmacology, 1994, 47(9): 1593 - 1599.
- [6] Zhang Y, Zhang K, Fang A F, et al. Specific adaptation of *Ustilaginoida virens* in occupying host florets revealed by comparative and functional genomics [J]. Nature Communications, 2014, 5: 3849 - 3860.
- [7] Qiu J H, Meng S, Deng Y Z, et al. *Ustilaginoida virens*: a fungus infects rice flower and threatens world rice production [J]. Rice Science, 2019, 26(4): 199 - 206.
- [8] 陈 旭, 邱结华, 熊 萌, 等. 稻曲病研究进展 [J]. 中国稻米, 2019, 25(5): 30 - 36.
- [9] 杨晓杰, 张少华, 李为争, 等. 粮食作物病虫害用药规律——基于对应分析途径的简明图解 [J]. 江苏农业科学, 2022, 50(7): 1 - 9.
- [10] 陶友权. 水稻稻曲病的发生规律与综合防控策略 [J]. 安徽农学通报, 2019, 25(14): 80 - 81.
- [11] 王 昆, 曹友仁, 李振兴, 等. 不同药剂防治水稻稻曲病田间药效试验 [J]. 湖南农业科学, 2022(4): 50 - 52.
- [12] 许淑莲. 稻曲病的发生与防治 [J]. 现代农村科技, 2019(6): 32 - 33.
- [13] Zhou Y X, Li H H, Yu J J, et al. First report of propiconazole resistance in field isolates of *Ustilaginoida virens* on rice in Jiangsu Province of East China [J]. Plant Disease, 2017, 101(5): 840 - 841.
- [14] Zhou Y X, Yua J J, Pan X Y, et al. Characterization of propiconazole field - resistant isolates of *Ustilaginoida virens* [J]. Pesticides Biochemistry and Physiology, 2108, 153: 144 - 151.
- [15] Pan X Y, Cao H J, Yu J J, et al. Monitoring and analysis of rice pathogen *Ustilaginoida virens* isolates with resistance to sterol demethylation inhibitors in China [J]. Phytopathology Research, 2020, 2: 4.
- [16] 潘夏艳, 朱 凤, 齐中强, 等. 江苏省稻瘟病菌对稻瘟灵的抗药性监测及特性分析 [J]. 植物病理学报, 2022, 52(3): 416 - 424.
- [17] 俞咪娜, 于俊杰, 曹慧娟, 等. 稻曲病菌 $Zn_2(II)$ Cys6 型转录因子 *UvZCI* 基因的克隆及功能分析 [J]. 江苏农业学报, 2021, 37(6): 1400 - 1408.
- [18] Fan J, Yang J, Wang Y Q, et al. Current understanding on *Villosiclava virens*, a unique flower - infecting fungus causing rice false smut disease [J]. Molecular Plant Pathology, 2016, 17(9): 1321 - 1330.
- [19] 杜一平. 稻曲病的发生与防治 [J]. 现代农村科技, 2020(10): 37.
- [20] 杜元中. 水稻稻曲病的发病因素及防控措施 [J]. 农技服务, 2021, 38(7): 82 - 83.
- [21] 邢 艳, 王 军, 杨 娟, 等. 水稻稻曲病的发生规律及防治方法 [J]. 植物医生, 2021, 34(4): 67 - 71.
- [22] Price C L, Parker J E, Warrilow A G S, et al. Azole fungicides - understanding resistance mechanisms in agricultural fungal pathogens [J]. Pest Management Science, 2015, 71(8): 1054 - 1058.
- [23] Schepers H T A M. Fitness of isolates of *Sphaerotheca fuliginea* resistant or sensitive to fungicides which inhibit ergosterol biosynthesis [J]. Netherlands Journal of Plant Pathology, 1985, 91: 65 - 76.
- [24] Tucker M A, Lopez - Ruiz, F, Cools H J, et al. Analysis of mutations in West Australian populations of *Blumeria graminis* f. sp. hordei CYP51 conferring resistance to DMI fungicides [J]. Pest Management Science, 2019, 76(4): 1265 - 1272.
- [25] Wang F, Lin Y, Yin W X, et al. The Y137H mutation of *VvCYP51* gene confers the reduced sensitivity to tebuconazole in *Villosiclava virens* [J]. Scientific Reports, 2015, 5: 17575 - 17587.