调 查 研 究
Investigations

我国人参产区灰霉病菌抗药性研究初报

刘 琨， 李 勇， 王 蓉， 陈炳蔚， 王天佑， 丁万隆*

（中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所，北京 100193）

摘要 人参灰霉病给人参生产造成巨大损失。本研究选取人参生产上常用的4种杀菌剂，对东北人参产区分离的102株灰霉菌进行抗性检测。结果表明，灰霉菌对多菌灵carbendazim(C)、嘧霉胺pyrimethanil(P)、异菌脲iprodione(I)、咯菌腈fludioxonil(F)的抗性频率分别为100%、86.27%、73.53%和30.39%，辽宁和吉林分离菌株对嘧霉胺、异菌脲的抗性高于3省平均水平。分离菌株对4种杀菌剂共有7种抗性类型，即$C_RP_RI_RF_S$、$C_RP_RI_RF_R$、$C_RP_RI_SF_S$、$C_RP_SI_SF_S$、$C_RP_SI_RF_S$、$C_RP_RI_SF_R$和$C_RP_SI_SF_R$，其所占比例分别为39.22%、26.47%、14.71%、7.84%、5.88%、4.90%和0.98%，未发现对4种杀菌剂均敏感的灰霉菌菌株。研究结果对于指导人参产区防治灰霉病杀菌剂的合理选用，有效降低人参农药残留，延缓灰霉菌抗性产生具有重要意义。

关键词 人参； 灰霉病； 抗药性； 杀菌剂； 灰葡萄孢

中图分类号： S 435.675 **文献标识码：** A **DOI：** 10.16688/j.zwbh.2019371

Preliminary report of the resistance of *Botrytis cinerea* isolates from ginseng producing area to four fungicides in China

LIU Kun， LI Yong， WANG Rong， CHEN Bingwei， WANG Tianyou， DING Wanlong*

（*Institute of Medicinal Plant Development*，*Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College*，*Beijing* 100193，*China*）

Abstract Gray mold causes great damage to ginseng production. In the present work，102 strains of *Botrytis cinerea* were isolated from ginseng collected from 20 ginseng producing area，and their resistance to four types of fungicides was determined by minimal inhibitory concentration（MIC）method. Results indicated that the resistance ratio of *B. cinerea* against carbendazim（C），pyrimethanil（P），iprodione（I）and fludioxonil（F）were 100%，86.27%，73.53% and 30.39%，respectively. Resistance of *B. cinerea* isolates from Liaoning and Jilin provinces were higher than the mean. Furthermore，seven resistance types，$C_RP_RI_RF_S$，$C_RP_RI_RF_R$，$C_RP_RI_SF_S$，$C_RP_SI_SF_S$，$C_RP_SI_RF_S$，$C_RP_RI_SF_R$ and $C_RP_SI_SF_R$，were detected，accounting for 39.22%，26.47%，14.71%，7.84%，5.88%，4.90% and 0.98%，respectively. *B. cinerea* isolates susceptible to four fungicides have not been found. The results are important for guiding the reasonable selection of fungicides for ginseng grey mold control，effectively reducing ginseng pesticide residues and delaying the emergence of resistant isolates.

Key words ginseng； gray mold； resistance； fungicide； *Botrytis cinerea*

灰霉病是我国农业生产上的重要病害，化学防治是防治灰霉病最为经济、有效，且使用最为普遍的方法。自20世纪70年代，研究者相继开发出苯并咪唑类、二甲酰亚胺类、N-苯基氨基甲酸酯类、苯基吡咯类、三唑类等灰霉病杀菌剂。灰霉菌繁殖快、遗传变异大，极易产生抗药性。目前，农业生产上灰霉病菌对嘧霉胺、嘧菌环胺、腐霉利、异菌脲、乙霉威、嘧菌酯胺等常用杀菌剂均已产生抗性，由于杀菌剂的不合理使用，田间已经出现“双抗”甚至“多抗”灰霉菌株系[1]。

人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 为五加科植物，别名棒槌、地精、神草等，是我国驰名中外的名贵药材，被誉为“百草之王”[2]。近年来人参灰霉病发生日

收稿日期： 2019－07－22 **修订日期：** 2019－09－12
基金项目： 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2016-I2M-3-017)；国家中药标准化项目(ZYBZH-C-JL-27)
* 通信作者 E-mail：wlding@implad.ac.cn

趋严重,已成为人参生产上的重要病害之一。据初步调查,长白山区人参灰霉病病田率已达 75%,病株率达到 5%～60%,人参灰霉病防治过程中杀菌剂使用不规范不仅造成人参农药残留超标,同时也严重影响了人参品质,给人参生产造成了巨大损失[3]。

目前,已有的报道主要集中在人参灰霉病杀菌剂筛选[3-4]、复配[5-6]、研发[7]等领域,人参灰霉菌抗药性报道相对较少。仅见 Lu 等[8]对吉林省长白县 76 株人参灰霉菌对多菌灵、异菌脲、嘧霉胺、嘧菌酯的抗药性研究。鉴于人参灰霉病在整个人参产区普遍发生的严峻形势,本研究在对黑龙江、吉林、辽宁人参产区灰霉菌株分离鉴定的基础上,进行室内抗药性检测,以期明晰我国人参产区灰霉病菌抗药性现状,为人参灰霉病防治提供参考。

1　材料与方法

1.1　人参灰霉菌菌株

2018 年 6 月－8 月分别从黑龙江、吉林、辽宁人参产区采集灰霉病样,共计分离、纯化获得 102 株灰霉病菌。不同产区分离获得的菌株信息详见表 1。全部菌株经显微形态学及分子鉴定,确认为灰葡萄孢 *Botrytis cinerea*。

表 1　供试人参灰霉菌菌株及其来源

Table 1　Isolates and sources of *Botrytis cinerea* tested in this study

序号 Serial number	采样地点 Location			菌株数 Number of isolates
1	辽宁	本溪桓仁	业主沟村	3
2	Liaoning		葫芦头	6
3			花溪	7
4		丹东宽甸	镇江镇石柱子村	5
5	吉林	白山靖宇	白山林村	7
6	Jilin	白山抚松	松江河	5
7			长白山西坡	4
8			东岗镇	1
9			万良	4
10			新屯子镇黄泥西山	2
11			泉阳镇错草村	2
12		白山长白县	长白西岗	6
13			十一道沟乡	2
14			新房子大顶子村	1
15		通化	富江乡	5
16		集安	台上镇双岔村	6
17	黑龙江	鸡西市	鸡西	5
18	Heilongjiang	伊春嘉荫县	乌云镇沪嘉乡	15
19		黑河市	罕达汽镇	11
20		黑河市逊克县	逊克里	5
合计 Total				102

1.2　供试杀菌剂

50%多菌灵可湿性粉剂,江苏蓝丰生物化工股份有限公司;500 g/L 异菌脲悬浮剂,苏州富美实植物保护剂有限公司;400 g/L 嘧霉胺悬浮剂,拜耳股份公司;25 g/L 咯菌腈悬浮剂,先正达南通作物保护有限公司。

1.3　菌株活化与菌饼制备

取 4℃保存的纯化菌株,20℃活化培养 3 d,在菌落边缘打取直径 5 mm 的菌饼,备用。

1.4　人参灰霉菌抗药性测定

采用最小抑制浓度法检测人参灰霉菌抗药性[9]。多菌灵和异菌脲工作浓度为 10 μg/mL,嘧霉胺工作浓度为 1 μg/mL,咯菌腈工作浓度为 0.1 μg/mL[10-13]。嘧霉胺使用 ASP 培养基,避免培养时间影响灰霉菌对供试杀菌剂的敏感性[11]。其余 3 种杀菌剂使用 PDA 培养基。除多菌灵用二甲基亚砜溶解外,其余杀菌剂均使用无菌水溶解制成母液。将培养基冷却到 50℃左右时,加入药剂母液后充分混匀,倒入直径 6 cm 培养皿内。将事先活化的灰霉菌饼接入含药平板中心。每菌株 3 次重复,以溶剂和等量无菌水作为空白对照。20℃黑暗培养 72 h 后统计杀菌剂的抗药性频率。完全不生长的为敏感菌株;反之,则为抗性菌株。

1.5　数据分析

使用 Excel 2017 对人参灰霉菌抗性频率、抗性类型相关数据进行统计分析。

2　结果与分析

2.1　人参灰霉病菌抗性频率

抗性检测结果(表 2)显示,东北 3 省人参产区的灰霉菌对多菌灵、嘧霉胺、异菌脲、咯菌腈的抗性频率分别为 100%、86.27%、73.53%和 30.39%。不同省份分离的菌株对嘧霉胺和异菌脲的抗性频率存在较大差异,对咯菌腈的抗性频率表现为略有差异。辽宁和吉林分离菌株对嘧霉胺、异菌脲的抗性高于 3 省平均水平,而黑龙江分离菌株低于平均水平。

2.2　人参灰霉病菌抗性类型

抗药性检测发现,供试人参灰霉病菌共 7 种抗性类型,即 $C_RP_RI_RF_S$、$C_RP_RI_RF_R$、$C_RP_RI_SF_S$、$C_RP_SI_SF_S$、$C_RP_SI_RF_S$、$C_RP_RI_SF_R$ 和 $C_RP_SI_SF_R$,其所占比例分别为 39.22%、26.47%、14.71%、7.84%、5.88%、4.90%和 0.98%(表 3)。黑龙江 7 种抗性类型均有分布,其

余两省分布有除 $C_RP_SI_SF_R$ 外的其余 6 种抗性类型。对 4 种杀菌剂均有抗药性的灰霉菌株($C_RP_RI_RF_R$)占 26.47%,三抗菌株($C_RP_RI_SF_R$ 和 $C_RP_RI_RF_S$)占 44.12%,双抗菌株($C_RP_RI_SF_S$、$C_RP_SI_RF_S$ 和 $C_RP_SI_SF_R$)占 21.57%,单抗菌株($C_RP_SI_SF_S$)占 7.84%,不存在对 4 种杀菌剂均敏感的灰霉菌株。其中,对多菌灵、嘧霉胺、异菌脲均具有抗性的灰霉菌株 $C_RP_RI_RF_S$ 类型占比最大(39.22%)。

表 2 人参灰霉病菌对 4 种杀菌剂的抗性频率

Table 2 Resistance ratio of *Botrytis cinerea* isolates against four fungicides

采样地点 Location	菌株数/株 Number of isolates	多菌灵 carbendazim		嘧霉胺 pyrimethanil		异菌脲 iprodione		咯菌腈 fludioxonil	
		抗性菌株/株 Resistant isolate	抗性频率/% Resistance rate	抗性菌株/株 Resistant isolate	抗性频率/% Resistance rate	抗性菌株/株 Resistant isolate	抗性频率/% Resistance rate	抗性菌株/株 Resistant isolate	抗性频率/% Resistance rate
辽宁 Liaoning	21	21	100	19	90.48	18	85.71	8	38.10
吉林 Jilin	45	45	100	43	95.56	34	75.56	11	24.44
黑龙江 Heilongjiang	36	36	100	26	72.22	23	63.89	12	33.33
合计 Total	102	102	100	88	86.27	75	73.53	31	30.39

表 3 人参灰霉病菌对 4 种杀菌剂的抗性类型[1)]

Table 3 Resistant types of *Botrytis cinerea* isolates to four fungicides

抗性类型 Resistant type	辽宁/% Liaoning	吉林/% Jilin	黑龙江/% Heilongjiang	合计/% Total
$C_RP_RI_RF_R$	33.33	24.44	25.00	26.47
$C_RP_RI_RF_S$	42.86	48.89	25.00	39.22
$C_RP_RI_SF_R$	9.52	2.22	5.56	4.90
$C_RP_RI_SF_S$	4.76	20.00	13.89	14.71
$C_RP_SI_RF_S$	4.76	2.22	11.11	5.88
$C_RP_SI_SF_R$	0	0	2.78	0.98
$C_RP_SI_SF_S$	4.76	2.22	16.67	7.84

1) C:多菌灵;P:嘧霉胺;I:异菌脲;F:咯菌腈;R:抗性;S:敏感。
C: carbendazim; P: pyrimethanil; I: iprodione; F: fludioxonil; R: Resistant; S: Susceptible.

3 讨论

本研究对供试的 4 种杀菌剂检测结果显示,部分灰霉菌菌株已对 4 种杀菌剂产生了抗性,且表现“全抗”的菌株在灰霉菌群体中所占比例较高,存在病害大流行风险。4 种杀菌剂中多菌灵已完全失去效果,在人参生产过程中建议停止使用。腐霉利和异菌脲均属于二甲酰亚胺类药剂,该类药剂是甘油三酯合成抑制剂,能够抑制菌丝生长和孢子萌发,因多年使用已导致病菌产生抗性,防治效果显著降低[14]。嘧霉胺属于苯并咪唑类杀菌剂,其作用靶点单一,易使病菌产生抗性,属于高抗性风险杀菌剂[15]。目前,东北人参产区灰霉菌对嘧霉胺和异菌脲的抗性很普遍[16]。苯吡咯类杀菌剂是一类新型、广谱、高效的内吸性杀菌剂,可抑制菌丝体生长、孢子萌发和芽管伸长[17]。东北地区人参灰霉病菌对咯菌腈的抗性频率较低。

在我国,多菌灵(苯并咪唑类)、腐霉利(二甲酰亚胺类)、异菌脲(二甲酰亚胺类)、咯菌腈(苯吡咯类)、嘧霉胺(苯胺基嘧啶类)、啶酰菌胺(烟酰胺类)、抑霉唑(咪唑类)及福美双(有机硫类)是防治人参灰霉病的常用杀菌剂。啶酰菌胺是新型烟酰胺类杀菌剂,药剂通过植物叶面渗透到植物体中并可在植物体中传导,其持效期长,被广泛应用于灰霉病的防治[18]。灰霉菌对啶酰菌胺敏感,在生产中可将啶酰菌胺与腐霉利、咯菌腈交替使用来延缓和治理抗性[19]。咪唑类杀菌剂又称为 DMIs 杀菌剂,其通过抑制 14-α-脱甲基酶使真菌体内的麦角甾醇生物合成受阻而起到抑菌作用。抑霉唑是 DMIs 杀菌剂中的一种,其与腐霉利、异菌脲、咯菌腈、嘧霉胺、啶酰菌胺及福美双不存在交互抗性,被广泛用于防治植物真菌病害[20]。福美双属于有机硫类杀菌剂,因存在杀菌能力弱、水溶性低、复配能力差等缺点,目前研究较少[21]。

综上,在人参生产上应尽快寻找新型可替代杀菌剂以防止灰霉病流行造成重大经济损失。另外,要尽快建立早期预警机制,在病害发生和流行初期用药,减少用药次数,防止抗性发生或延缓抗性群体的形成;还要根据抗性菌株的区域分布、抗性频率和水平制定科学合理的用药措施。

参考文献

[1] 张国珍,钟珊. 草莓灰霉病研究进展[J]. 植物保护,2018,44(2):1-10.

(下转 208 页)

逐代递减，越冬代和第 1 代成虫占全年成虫发生量的 77.1%，是主要发生代。而当温度高于 20℃时，种群发生量随温度的增加而增大，2017 年 5 月份温度较 2016 年低，其 1 代成虫发生量约是 2016 年的 50%。

参考文献

[1] 范仁俊，刘中芳，陆俊姣，等. 我国梨小食心虫综合防治研究进展[J]. 应用昆虫学报，2013，50(6)：1509－1513.

[2] 马之胜，贾云云，王越辉，等. 桃园梨小食心虫发生规律研究进展[J]. 江西农业学报，2012，24(10)：59－61.

[3] 王越辉，马之胜，贾云云，等. 梨小食心虫生物学特性的研究进展[J]. 江西农业学报，2013，25(12)：75－77.

[4] 周仙红，李丽莉，张思聪，等. 梨小食心虫发生规律及无公害防治技术[J]. 山东农业科学，2011(10)：76－81.

[5] 薛根生，杨玉琼，张萍. 库尔勒地区梨小食心虫的发生与综合防治[J]. 巴州科技，2008(4)：11－12.

[6] 张利军，赵志国，李丫丫，等. 不同栽培管理梨园梨小食心虫发生程度研究[J]. 应用昆虫学报，2013，50(6)：1532－1537.

[7] 植玉蓉，叶晓惠，兰英，等. 果树混栽区梨小食心虫的发生规律与防治措施[J]. 西南农业学报，2008，21(4)：1006－1009.

[8] 岳朝阳，张新平，杨森，等. 喀什地区杏园内食心虫消长动态及赤眼蜂防治初探[J]. 新疆农业科学，2010，47(12)：2376－2380.

[9] 林伟丽，于江南，薛光华，等. 新疆阿克苏地区苹果蠹蛾和梨小食心虫消长规律的研究[J]. 新疆农业科学，2006，43(2)：100－102.

[10] 张仁福，于江南，方斌，等. 性诱剂在杏园梨小食心虫防治中的应用[J]. 新疆农业科学，2010，47(8)：1517－1521.

[11] 张长禄，陈红刚. 梨小食心虫的发生与防治[J]. 北方果树，2011(4)：42.

[12] MYERS C T, HULL L A, KRAWCZYK G. Effects of orchard host plants (apple and peach) on development of oriental fruit moth (Lepidoptera: Tortricidae) [J]. Journal of Economic Entomology, 2007, 100(2): 421－430.

（责任编辑：杨明丽）

（上接 198 页）

[2] 么厉，程惠珍，杨智. 中药材规范化种植(养殖)技术指南[M]. 北京：中国农业出版社，2006：293.

[3] 魏晓兵，付俊范，李自博，等. 不同生物杀菌剂对人参灰霉病的室内毒力及田间防效[J]. 植物保护，2015，41(5)：217－220.

[4] 付俊范，李昕月，魏晓兵，等. 防治人参灰霉病的药剂筛选及其田间防效[J]. 中国植保导刊，2015，35(2)：69－72.

[5] 王春伟，白庆荣，高洁，等. 22 种杀菌剂及其不同配比对人参灰霉病菌的毒力测定[J]. 农药，2011，50(1)：61－64.

[6] 李公启，孙国刚，王世伦，等. 腐霉利与己唑醇复配防治人参灰霉病试验研究[J]. 人参研究，2014，26(4)：57.

[7] 潘晓曦，关一鸣，张舒娜，等. 中药提取物对人参灰霉病的防治效果[J]. 江苏农业科学，2015，43(2)：124－126.

[8] LU Xiaohong, JIAO Xiaolin, HAO Jianjun, et al. Characterization of resistance to multiple fungicides in *Botrytis cinerea* populations from Asian ginseng in northeastern China [J]. European Journal of Plant Pathology, 2016, 144(3): 467－476.

[9] 张亚，王翀，刘双清，等. 湖南省草莓灰霉病菌对 4 种杀菌剂的抗药性检测[J]. 植物保护，2016，42(5)：181－187.

[10] BARDAS G A, VELOUKAS T, KOUTITA O, et al. Multiple resistance of *Botrytis cinerea* from kiwifruit to SDHIs, QoIs and fungicides of other chemical groups [J]. Pest Management Science, 2010, 66(9): 967－973.

[11] HILBER U W, SCHüEPP H. A reliable method for testing the sensitivity of *Botryotinia fuckeliana* to anilinopyrimidines *in vitro* [J]. Pest Management Science, 1996, 47(3): 241－247.

[12] LENNOX C L, SPOTTS R A. Sensitivity of populations of *Botrytis cinerea* from pear-related sources to benzimidazole and dicarboximide fungicides [J]. Plant Disease, 2003, 87(6): 645－649.

[13] 贡常委，秦旖曼，屈劲松，等. 四川省草莓灰霉病菌对咯菌腈的抗性测定及其机制[J]. 中国农业科学，2018，51(22)：64－74.

[14] 祁之秋，王建新，陈长军，等. 现代杀菌剂抗性研究进展[J]. 农药，2006，45(10)：655－659.

[15] LEROUX P, CHAPELAND F, DESBROSSES D, et al. Patterns of cross-resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards-biological and chemical approaches [J]. Crop Protection, 2000, 18(10): 687－697.

[16] 王克勤. 灰霉病菌抗药性研究进展及防治对策[J]. 黑龙江农业科学，2000(5)：40－41.

[17] 郑媛萍. 我国葡萄灰霉病菌对主要杀菌剂的抗药性检测[D]. 北京：中国农业科学院，2018.

[18] 尹大芳. 浙江省草莓灰霉病菌抗药性检测及抗性机制的研究[D]. 杭州：浙江大学，2015.

[19] 纪明山，刘妍，朱赫，等. 辽宁省番茄灰霉病菌对常用杀菌剂的抗药性监测与交互抗药性[J]. 农药，2017，56(9)：676－678.

[20] 郑媛萍，周连柱，孔繁芳，等. 山东蓬莱葡萄灰霉菌对 7 种杀菌剂的抗药性检测[J]. 植物保护，2019，45(1)：164－169.

[21] 张磊，张迪彦. 一种有机硫杀菌剂的合成及性能评价[J]. 工业用水与废水，2014，45(3)：44－46.

（责任编辑：杨明丽）