

# 赣南脐橙绿霉病菌对常用杀菌剂抗性监测

王明爽<sup>1</sup>, 孙颖<sup>1</sup>, 陈国庆<sup>1</sup>, 方贻文<sup>2</sup>, 夏长秀<sup>2</sup>, 李红叶<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 浙江大学生物技术研究所, 杭州 310029; <sup>2</sup> 赣州市脐橙研究所, 赣州 404000)

**摘要:** 本文研究了来自赣南 7 个县的柑橘绿霉病菌 (*Penicillium digitatum*) 种群对该地区常用杀菌剂抑霉唑、咪鲜胺、甲基硫菌灵和百可得的抗性频率、抗性水平和对抑霉唑的抗性分子机制。结果表明: 病菌对抑霉唑和咪鲜胺存在基本一致的抗性; 2011 和 2012 年病菌种群对抑霉唑和咪鲜胺的抗性频率分别为 82% 和 90%, 平均抗性倍数为 51.5 倍, 抗性分子机制均属于 IMZ-R3, 即 *CYP51B* 基因启动子区发生 199 bp 插入的突变; 病菌种群对甲基硫菌灵的抗性频率分别为 82% 和 91%; 病菌种群对百可得均表现敏感。本研究为采后柑橘病害防治药剂选择提供了科学的依据。

**关键词:** 赣南脐橙; 绿霉菌; 杀菌剂抗性; 抗性分子机制

**Resistance monitoring of *Penicillium digitatum* from Gannan navel orange to commonly used fungicides** WANG Ming-shuang<sup>1</sup>, SUN Ying<sup>1</sup>, CHEN Guo-qing<sup>1</sup>, FANG Yi-wen<sup>2</sup>, XIA Chang-xiu<sup>2</sup>, LI Hong-ye<sup>1</sup> (<sup>1</sup> Institute of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; <sup>2</sup> Navel Orange Research Institute of Ganzhou, Ganzhou 404000, China)

**Abstract:** The frequency and level of resistance of *Penicillium digitatum* population from 7 counties of Gannan, Jiangxi Province to commonly used fungicide imazalil, prochloraz, thiophanate-methyl and iminoctadine tris, as well as the resistant molecular mechanism to imazalil were studied. The results showed that the consistent resistance to imazalil and prochloraz was presented in *P. digitatum*. The resistant frequencies of *P. digitatum* to imazalil were 82% and 90% in 2011 and 2012, respectively. The average resistant factor was 51.5. The resistance molecular mechanism of *P. digitatum* to imazalil from Gannan belonged to IMZ-R3, which was conferred by an insertion mutation of 199 bp in the promoter region of *CYP51B* gene. The resistant frequencies of *P. digitatum* to thiophanate-methyl were 82% and 91% in 2011 and 2012, respectively. However, all strains tested in the study were sensitive to fungicide iminoctadine tris. The study provided a scientific basis for the choice of fungicides in the post-harvest disease control of citrus.

**Key words:** Gannan navel orange; *Penicillium digitatum*; fungicide resistance; molecular mechanism of fungicide resistance

中图分类号: S432.44

文献标识码: A

文章编号: 0412-0914(2013)05-0532-09

## 1 引言

赣州位于江西省南部, 简称赣南, 是我国橙类适栽区和柑橘优势产业带, 2011 年赣南脐橙种植面积达 12 万 hm<sup>2</sup>, 总产量达 140 万 t。绿霉病

(*Penicillium digitatum*) 是包括脐橙在内柑橘类水果采后的最主要病害, 造成的损失通常占整个柑橘贮藏期病害损失的 90% 以上<sup>[1]</sup>。柑橘绿霉病菌分布广泛, 可以在多种有机质上腐生, 并产生大量的分生孢子, 通过气流传播, 经各种伤口侵入<sup>[2]</sup>。采

收稿日期: 2012-10-10; 修回日期: 2013-07-22

基金项目: 国家现代农业(柑橘)产业技术体系专项经费(MATS); 公益性行业(农业)科研专项(201203034)

通讯作者: 李红叶, 教授, 从事植物病理学研究; E-mail: hlyli@zju.edu.cn

第一作者: 王明爽, 男, 山东烟台人, 硕士研究生, 从事柑橘贮藏期病害研究; E-mail: wangmingshuang0916@126.com。

前或采后杀菌剂处理是国内外防治柑橘绿霉病的主要手段,14- $\alpha$ -脱甲基酶抑制剂(14- $\alpha$ -demethylation inhibitors, DMIs) 杀菌剂抑霉唑和咪鲜胺,苯并咪唑类杀菌剂噻菌灵、甲基硫菌灵和多菌灵,以及双胍盐杀菌剂百可得是赣南脐橙防治采后病害的常用杀菌剂。

DMIs 杀菌剂的作用机制是抑制菌体麦角甾醇的合成途径中的 14- $\alpha$ -脱甲基酶活性。自 1987 年美国首次报道抗 DMIs 的柑橘绿霉病菌菌系后,世界各地相继报道柑橘绿霉病菌抗这类药剂的问题<sup>[3-6]</sup>。目前报道的柑橘绿霉病菌对 DMIs 产生抗性的分子机制有 3 种,即 IMZ-R1 型,其 *CYP51A* 基因启动子区有额外的 4 个 126 bp 串联重复插入突变<sup>[7]</sup>; IMZ-R2 型,其 *CYP51A* 基因启动子区有 199 bp 的插入突变<sup>[8,9]</sup> 和 Sun 等<sup>[10]</sup> 发现 IMZ-R3 型,其 *CYP51B* 基因启动子区存在 199 bp 的插入突变。靶标基因(*CYP51A* 或 *CYP51B*) 基因启动子区发生了片段插入的突变,均导致靶标基因表达的上升<sup>[8-11]</sup>。最新研究发现,黄曲霉(*Aspergillus flavus*) *CYP51C* 基因 4 个核苷酸位点发生错义突变导致对 DMIs 产生抗性<sup>[12]</sup>。DMIs 对柑橘绿霉病的防治效果因抗性菌系产生和种群的扩大而受到严重的影响<sup>[13,14]</sup>。苯并咪唑类杀菌剂的作用机制是药剂与病菌的  $\beta$  微管蛋白结合,阻止微管的组装,破坏了纺锤体的形成,影响细胞分裂<sup>[15]</sup>。随着药剂的连续使用,抗这类药剂的菌系逐渐产生,种群不断扩大,以致这类药剂的防效丧失<sup>[4,16,17]</sup>。 $\beta$  微管蛋白 198 或 200 位氨基酸发生点突变是柑橘绿霉病菌对苯并咪唑类杀菌剂抗性产生的分子机制<sup>[5]</sup>。有关柑橘绿霉病菌对双胍盐的抗性尚未见报道。

定期监测,掌握病菌种群抗常用药剂菌系的动态和抗性水平是植物病害综合治理的重要环节。本文报道了 2011 年 1 月和 2012 年 1 月从赣南部分脐橙加工包装厂分离的绿霉病菌对常用杀菌剂抑霉唑、咪鲜胺、甲基硫菌灵和百可得的抗性测定结果,其结果对指导脐橙采后处理药剂的选择具有指导作用。

## 2 材料与方法

### 2.1 供试菌株和药剂

分别于 2011 和 2012 年 1 月从江西赣州安远

县、大余县、寻乌县、于都、会昌和南康等县的部分脐橙加工厂中随机选择若干绿霉病病果,用灭菌牙签从病果的霉层上刮取少量病菌分生孢子,转入灭菌的离心管中,带回实验室进行单孢纯化。纯化时向每离心管加入适量的无菌水(含 0.1% 吐温-20),配制成浓度为  $10^3$  个/mL 孢子悬浮液,取其中 0.1 mL 涂布于含 0.1 mg/mL 链霉素的 PDA 平板之上。4~5 d 后挑单孢菌落转入 PDA 斜面上,4℃ 保存备用。菌株信息见表 1。

22.2% 抑霉唑(imazalil)乳油,美国仙农有限公司;45% 咪鲜胺乳油,以色列马克西姆化学公司;40% 百可得可湿性粉剂,日本曹达株式会社;70% 甲基硫菌灵可湿性粉剂,日本曹达株式会社。

### 2.2 抗性频率测定

对抑霉唑、咪鲜胺和百可得的抗性划分标准参考 Ghosop 等<sup>[8]</sup>的方法,将在含 0.1  $\mu\text{g/mL}$  抑霉唑、咪鲜胺或百可得的 PDA 培养基上不能生长的菌株(即  $\text{MIC} \leq 0.1 \mu\text{g/mL}$ ) 定义为敏感菌株(S);将在含 0.5  $\mu\text{g/mL}$  或以上的抑霉唑、咪鲜胺或百可得的 PDA 培养基上能生长的菌株(即  $\text{MIC} \geq 0.5 \mu\text{g/mL}$ ) 定义为高抗性菌株(HR);将在含 0.1  $\mu\text{g/mL}$  抑霉唑、咪鲜胺或百可得的培养基上能生长,而在 0.5  $\mu\text{g/mL}$  培养基上不能生长的菌株( $0.1 \mu\text{g/mL} \leq \text{MIC} \leq 0.5 \mu\text{g/mL}$ ) 定义为中抗菌株(MR)。以有效成分为 10  $\mu\text{g/mL}$  甲基硫菌灵为鉴别浓度,将在含 10  $\mu\text{g/mL}$  甲基硫菌灵培养基上不能生长的菌株( $\text{MIC} \leq 10.0 \mu\text{g/mL}$ ) 定义为敏感菌株(S),在 100  $\mu\text{g/mL}$  的 PDA 培养基上还能生长的菌株( $\text{MIC} \geq 100.0 \mu\text{g/mL}$ ) 定义为高抗性菌株(HR),而将在 10.0  $\mu\text{g/mL}$  能生长,100.0  $\mu\text{g/mL}$  培养上不能生长的菌株( $10.0 \mu\text{g/mL} \leq \text{MIC} \leq 100.0 \mu\text{g/mL}$ ) 定义为中抗菌株(MR)。测定方法为:从刮取 PDA 上培养 5 d 的绿霉病菌分生孢子,配制成  $10^7$  个/mL 孢子悬浮液,取 2  $\mu\text{L}$  滴于含上述浓度药剂的 PDA 平板上,5 d 后观察平板上是否有菌落形成,根据其 MIC 值,确定菌株对药剂的抗/感性。

### 2.3 对抑霉唑抗性水平测定

先用无菌水将 22.2% 的抑霉唑乳油稀释成有

效成分为 1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的母液,再用无菌水稀释成梯度浓度药液,将其加入到 50℃左右特定体积的 PDA 培养基中,配成一系列不同浓度的含药培养基。其中,测定敏感菌株  $\text{EC}_{50}$  值所用的抑霉唑的浓度梯度为 0 (对照)、0.02、0.04、0.08、0.10 和 0.20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,测定抗性菌株  $\text{EC}_{50}$  值所用的抑霉唑的浓度梯度为 0 (对照)、0.5、1.0、2.0、4.0 和 8.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。将 100  $\mu\text{L}$  浓度为每 mL 含  $1 \times 10^6$  个孢子的孢子悬浮液均匀涂布在 PDA 平板上,25℃培养 2 d,打取直径为 5 mm 的菌碟,接种在一系列浓度的抑霉唑 PDA 平板中央,25℃下培养 7 d,交叉法测量菌落大小,每处理重复 3 次,计算菌丝生长抑制率,以浓度对数(X)与抑制百分率的机率值(Y),用 DPS v7.05 软件求取抑霉唑对柑橘绿霉病菌的毒力回归方程及有效中浓度  $\text{EC}_{50}$  值。整个试验重复 2 次。

## 2.4 抑霉唑抗性分子机制

收集在 PDA 上培养 7d 的柑橘绿霉病菌分生孢子,加液氮研磨后用十六烷基三甲基溴化铵法(CTAB)法<sup>[18]</sup>提取病菌的基因组 DNA 备用。

根据绿霉病菌已有的 3 种 DMIs 抗性分子机制<sup>[7-11]</sup>,本实验室建立应用 PCR 法快速检测不同抗性分子机制的技术<sup>[7,10]</sup>。本研究利用已有的技术对赣南脐橙绿霉病菌种群的 DMIs 抗性分子机制进行鉴定。以经测序证实为 DMI 不同抗性类型的代表菌株 PdKH8 (IMZ-S), Pd01 (IMZ-R1), Pd1d (IMZ-R2) 和 Pdw03 (IMZ-R3) 的 DNA 为对照,以待测菌株的基因组 DNA 为模板,首先使用检测 IMZ-R1 和 IMZ-R2 的特异性引物 CYP51A1 (5'-TAGCTCCAAAACAAATCGTCTGCC-3') 和 CYP51R2 (5'-GGTGAAGATATTGCCGTACTAG-AC-3')<sup>[11]</sup>对所有菌株进行 PCR 扩增,电泳后,通过比较待测菌株和对照菌株扩增条带图谱特征,确定待测菌株基因型。然后再应用检测 IMZ-R3 抗性分子机制的特异性引物对 B1 (5'-TATAGCGA-CATTAGTTTGGC-3') 和 B2 (5'-AGGAAAGTTG-CAGAGAGACCCAT-3')<sup>[10]</sup>,对所有待测菌株进行是否属于 IMZ-R3 的鉴定。PCR 反应体系(20  $\mu\text{L}$ ):DNA 1  $\mu\text{L}$  (0.1~0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), 10  $\times$  buffer 2  $\mu\text{L}$ , dNTP (2.5 mmol/L) 2  $\mu\text{L}$ ,  $\text{MgCl}_2$  (25 mmol/L)

1.6  $\mu\text{L}$ 、引物(5  $\mu\text{mol}/\text{L}$ )各 2  $\mu\text{L}$ 、*Taq* DNA 聚合酶(5 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.2  $\mu\text{L}$ ,以双蒸水补足至 20  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应参数为:PCR 条件:94℃预变性 4 min, 92℃ 50 s, 56℃ 45 s, 72℃ 75 s, 32 个循环;72℃延伸 10 min。电泳条件:电压 120 V, 电流 400 mA, 时间 35 min。

PCR 产物经 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit 试剂盒回收后送 Invitrogen(上海)贸易有限公司测序,进一步验证实验结果。

## 2.5 IMZ-R3 菌株与敏感菌株的菌丝生长与产孢能力比较

随机选择来自赣南的 10 个抑霉唑敏感菌株, 10 个抑霉唑抗性菌株,比较这些菌株在无抑霉唑培养基上的菌丝生长和产孢能力。菌丝生长比较采用菌丝生长速率法,比较培养 6 d 后所形成的菌落直径(cm)。分生孢子相对产生量则以波长 425 nm 下测得孢子悬浮液的 OD 值来表示。具体做法是,向培养 6 d 的菌落中加入 5 mL 含 0.1% 吐温-20 的无菌水,用干净的玻棒轻轻刮下菌落上的分生孢子,吸取 1 mL,稀释 10 倍后,在紫外分光光度计上测定其  $\text{OD}_{425}$  吸光值,通过比较吸光值大小确定菌株相对产孢能力(高表示孢子浓度高,低表示孢子浓度低)。每个菌株设 3 次重复,实验数据采用 DPS v7.05 软件进行单因素方差分析及 LSD 多重比较。整个试验重复 2 次。

## 3 结果与分析

### 3.1 各加工厂病菌种群抗性频率检测结果

利用设定的鉴别浓度(抑霉唑、咪鲜胺和百可得为 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 甲基硫菌灵为 10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 100.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 测定了 2011 和 2012 年从赣南采集的绿霉病菌种群对 4 种药剂抗性性质。结果表明,在 2011 年测定的 60 个菌株中,对甲基硫菌灵表现抗性的有 49 个,占 82%,而且均表现为高抗;病菌种群中对抑霉唑表现抗性的菌株为 49 个,占 82%,其中高抗菌株有 34 个,比例为 57%。对咪鲜胺的抗性情况与对抑霉唑的抗性基本一致,但一些对抑霉唑中抗的菌株对咪鲜胺表现为高抗。相对而言,安远县绿之源石榴坑加工

厂中的病菌种群对甲基硫菌灵、抑霉唑和咪鲜胺最敏感,来自该加工厂的 13 菌株中有 6 个菌株对该 3 种药剂均敏感,敏感菌株的比例为 46%。而来自其他加工厂的菌株几乎均为该 3 种药剂的抗性菌系。从来自南康县柑橘所谭口基地果园的 4 个落地果上的菌株均为甲基硫菌灵和抑霉唑敏感菌株。然而,病菌种群对百可得均表现为敏感(表 1)。

采于 2012 年的 133 个菌株中,对甲基硫菌灵表现抗性的有 121 个,占 91%,均为高抗。对抑霉唑和咪鲜胺表现抗性的有 120 个,占 90%,其中对抑霉唑高抗菌株有 113 个,占 85%,对咪鲜胺高抗菌株有 116 个,占 87%。来自寻乌两个果园 5 个落地果上的 5 个菌株均为甲基硫菌灵和抑霉唑敏感菌株。相比其他加工厂,信丰绿萌果业和会昌绿丰果业病菌种群中的抗性菌系比例稍低,分别为 40% 和 62.5%。与 2011 年类似,各加工厂病菌种群对百可得基本表现为敏感,只有从安远和寻乌两地发现的 11 个菌株能在含 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的百可得的培养基上有微弱的生长(表 1)。

赣南脐橙上的绿霉病菌种群对抑霉唑和咪鲜胺存在基本一致的抗或敏感的表型。不仅如此,抗抑霉唑和咪鲜胺的菌株也同时抗甲基硫菌灵,抗甲基硫菌灵的菌株中只有 1 个菌株对抑霉唑和咪鲜胺表现为敏感。

### 3.2 对抑霉唑的抗性水平

测定 2011 年 1 月采自安远、大余、寻乌和南康的 60 菌株的  $\text{EC}_{50}$  值发现,最敏感菌株的为 0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,而最抗菌株的为 8.42  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,均来自安远,抗性差异达 168.4 倍。敏感菌株的平均  $\text{EC}_{50}$  为 0.082  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,低抗菌株的平均  $\text{EC}_{50}$  值为 0.32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,是敏感菌株的 4 倍;抗性菌株的平均  $\text{EC}_{50}$  值为 4.22  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,为敏感菌株的 51.5 倍(表 2)。从结果中还可以看出,抗性菌株之间的  $\text{EC}_{50}$  值差异也很大,抗性最低的与最高的差异达 17 倍。

### 3.3 对抑霉唑的抗性分子机制分析

PCR 扩增产物电泳结果表明,当使用 CYP51A1 和 CYP51R2 引物可从已知的 IMZ-R1 型和 IMZ-R2 型对照菌株中则扩增获得 1 000 bp 和 700 bp 的条带,从已知的 IMZ-S 菌株中扩增获得

大小为 500 bp 的条带。用这对引物对所有菌株,无论是从敏感菌株,低抗菌株,还是抗性菌株均只得到大小约 500 bp 的条带(图 1)。由此可见,来自赣南抗性菌株的抗性分子机制既不是 IMZ-R1 也不是 IMZ-R2。当使用 B1/B2 引物对所有菌株进行 PCR 扩增时,从所有敏感菌株中获得大小约 400 bp 的条带,与对照的敏感菌株,IMZ-R1 和 IMZ-R2 菌株中扩增的条带大小一致,从来自赣南的所有抑霉唑低抗和抗性菌株中扩增获得大小约 600 bp 的条带,其大小与已知的 IMZ-R3 对照菌株的一致(图 2)。同样,扩增片段的测序结果也与 IMZ-R3 菌株中 199 bp 的插入序列<sup>[10]</sup>一致。由此可见,赣南脐橙绿霉病菌对抑霉唑的抗性分子机制均属于 IMZ-R3 型,即 CYP51B 基因启动子区 199 bp 插入突变。

### 3.4 IMZ-R3 型菌株与敏感菌株的菌丝生长与产孢能力比较

试验比较了 10 个抑霉唑敏感菌株和 10 个抑霉唑抗性菌株在不含抑霉唑培养基上培养 6 d 后的菌落直径和产孢情况,比较结果见表 3。IMZ-R3 菌株的菌丝生长速率显著低于 IMZ-S 菌株( $p = 0.0001$ ),但 IMZ-R3 和 IMZ-S 菌株在产孢量上并没有显著差异( $p = 0.116$ )。由此可见,在无药情况下,IMZ-R3 抗性菌株的菌丝生长速率不及敏感菌株,但产孢能力并没受到影响,相反单位面积菌落上所形成的分生孢子反而比敏感菌株更多。肉眼观察比较 IMZ-R3 和 IMZ-S 菌株在培养皿上所形成的分生孢子量也可发现这个现象。

## 4 结论与讨论

本研究评价了最近两年来自赣南脐橙上共 193 个绿霉病菌菌株对苯并咪唑类、DMIs 和双胍盐类杀菌剂的抗性,结果发现病菌种群对苯并咪唑类和 DMIs 存在普遍的抗性,抗性菌系的比例均高达 90% 以上(2012 年),且多为双抗。病菌种群对双胍盐类杀菌剂则表现敏感或具极低水平的抗性。病菌对抑霉唑和咪鲜胺的抗性基本一致,抗 DMIs 的分子机制均为 IMZ-R3。研究还发现,在无药培养基上,IMZ-R3 菌株的菌丝生长明显弱于敏感菌株,但单位面积菌落上产生的分生孢子量反而强过敏感菌株。





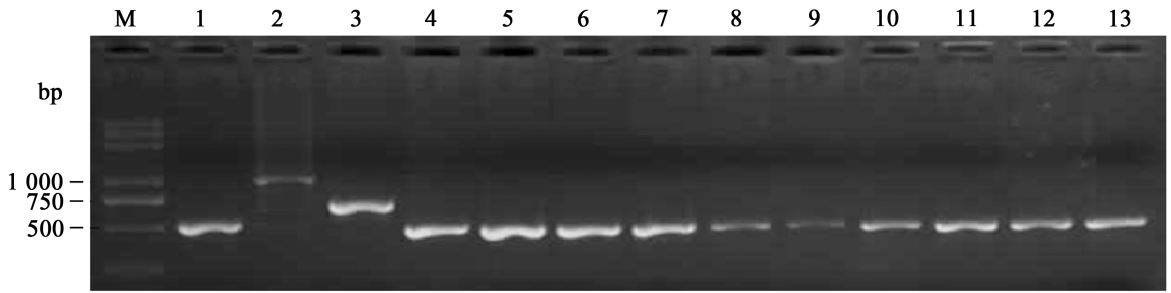


Fig. 1 PCR identification of imazalil resistant molecular mechanism by using primers CYP51A1/CYP5IR2

Fragment about 500 bp, 1 000 bp, 700 bp and 500 bp (lane 1-4) was amplified from the molecular mechanism known strain IMZ-S (PdKH8), IMZ-R1 (Pd01), IMZ-R2 (Pd19d) and IMZ-R3 (PdW03) respectively; All of the IMZ-S and IMZ-R strains gathered from Gannan produce the same fragment about 500 bp (lane 5-13). M: DNA Marker.

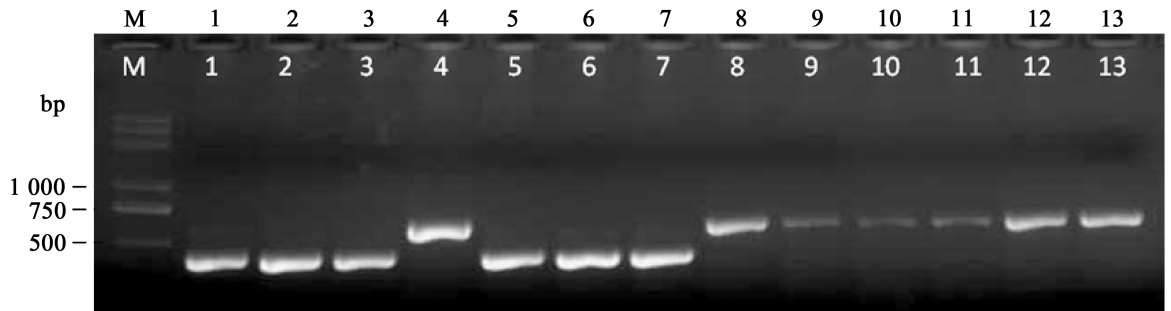


Fig. 2 PCR identification of imazalil resistant molecular mechanism by using primers B1/B2

Fragments about 400 bp (lane 1-3) were amplified from IMZ-S (PdKH8), IMZ-R1 (Pd01) and IMZ-R2 (Pd19d) and 600 bp (lane 4) was from PdW03; The IMZ-S strains gathered from Gannan produce fragments about 400 bp (lane 5-7) and the IMZ-R strains from there have 600 bp ones (lane 8-13). M: DNA Marker.

Table 3 Comparison of radial growth and conidiation of IMZ-R3 and IMZ-S of *Penicillium digitatum* on fungicide-free medium

Strain type	Mean of diameter (cm)	Significant level		Mean of Relative spore production (OD)	Significant level	
		5%	1%		5%	1%
IMZ-S	6.36 ± 0.41	a	A	0.43 ± 0.13	a	A
IMZ-R3	5.14 ± 0.33	b	B	0.36 ± 0.06	a	A

上世纪 70 ~ 80 年代, 苯并咪唑类杀菌剂被世界各柑橘产区广泛用于柑橘采后病害的防治, 由于抗性问题的, 而逐渐被淘汰, 被 DMIs 或更新的杀菌剂所取代<sup>[1,13,16]</sup>。2010 年在浙江衢州, 虽然苯并咪唑类杀菌剂在采后柑橘的防腐处理中已停用近 20 年, 但柑橘绿霉病菌种群对苯并咪唑抗性的频率仍超过 54%<sup>[5]</sup>。据笔者 2012 年的调查, 赣南脐橙产

区不少加工厂至今仍然使用甲基硫菌灵作为成分之一, 与 DMI 杀菌剂或百可得混合用于脐橙的采后防腐处理。鉴于本研究发现赣南柑橘绿霉病菌对苯并咪唑类杀菌剂的抗性频率超过 90%, 抗性菌株均属于高抗, 加之实验室刺伤接种苯并咪唑类抗性菌株, 再用有效浓度为 1 000 μg/mL 甲基硫菌灵处理, 对病害的控制效果几乎为零 (另文发

表)的事实,建议淘汰苯并咪唑类杀菌剂在赣南柑橘产区的采后病害防治中的应用。

柑橘绿霉病菌对 DMIs 抗性最早于 1987 年(在抑霉唑使用 6 年后)在美国加州首次报道<sup>[3]</sup>,在 1990 年该地区的抗性比例即达到 77.2%<sup>[10]</sup>。2011 年浙江省衢州柯城和衢江 2 个主产区柑橘绿霉菌抗抑霉唑菌系比例分别高达 77.1% 和 62.5%<sup>[5]</sup>。本实验中,2011 和 2012 年江西赣州抗性菌系比例分别高达 82% 和 90%。虽然抗性菌株对 DMIs 的抗性频率很高,但抗性水平并不高,浙江衢州柯城和衢江区抗性菌株的平均  $EC_{50}$  值只有 2.07  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 2.35  $\mu\text{g}/\text{mL}$ <sup>[5]</sup>,2011 年赣州柑橘主产区安远和寻乌两地抗性菌株的平均  $EC_{50}$  分别为 4.31  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 4.20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ (表 2),美国加利福尼亚州抗性菌株的平均  $EC_{50}$  也只有 1.45  $\mu\text{g}/\text{mL}$ <sup>[17]</sup>。由此可见,柑橘绿霉菌对 DMIs 类药剂抗性虽普遍存在,但抗性仍处于较低水平,在柑橘的采后病害防治中,可通过提高药剂浓度,改进使用方法,如与  $\text{NaHCO}_3$  混用等途径提高对绿霉病的防治效果<sup>[19]</sup>。

抑霉唑和咪鲜胺同属 DMIs,其杀菌机制均为抑制麦角甾醇的合成途径中的 14- $\alpha$ -脱甲基反应,对这 2 种药剂之间存在交互抗性并不难理解。与 DMIs 不同,苯并咪唑类杀菌剂的作用机制是阻止微管的组装,破坏了纺锤体的形成,影响细胞分裂<sup>[15]</sup>。但本研究发现在赣南,抗 DMIs 的菌株均抗苯并咪唑类杀菌剂,结果与冯丹等报道的一致<sup>[5]</sup>。这种双抗菌株的产生可能与 2 类药剂先后在产区中普遍使用有关。

在浙江衢州,所有的 IMZ 抗性菌株的抗性机制均属于 IMZ-R3 型,即 *CYP51B* 基因启动子区存在 199 bp 的突变<sup>[10]</sup>。本研究发现在赣南柑橘绿霉菌菌系对 DMIs 的抗性分子机制也均属于 IMZ-R3。IMZ-R3 型菌株在全国柑橘主产区是否已普遍存在仍需进一步扩大范围进行采样、调查。Holmes 等<sup>[20]</sup>比较抑霉唑抗性菌株和敏感菌株的适应性发现,在无药剂选择压时抗性菌株的适应性不及敏感菌株。尽管无法确定 Holmes 等实验所用菌株的抗性分子机制,但从 Ghosop 等<sup>[9]</sup>报道的美国加州抑霉唑抗性菌株的抗性分子机制时未发现 IMZ-R3,可以推测 Holmes 实验所用菌株的属于 IMZ-R1 或/和 IMZ-R2。本研究发现在无药培

养基上,尽管 IMZ-R3 菌株的菌丝生长不及敏感菌株,但产孢水平并没有下降,单位面积菌落上反而可产生更多的分生孢子,推测这类菌系的适应性较强,IMZ-R3 菌系在产区为优势菌群,对继续使用 DMIs 防治柑橘采后病害带来更大的风险。

在美国,氟苯吡咯类杀菌剂咯菌腈(fludioxonil)、甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂啞菌酯(azoxystrobin)和嘧啶胺类杀菌剂啞霉胺(pyrimethanil)在采后柑橘中的使用已获得登记<sup>[1,21]</sup>。本实验室的研究结果也表明,啞霉胺单剂或啞霉胺和抑霉唑的混合剂对抑霉唑抗性菌株有效<sup>[14]</sup>。新型药剂的使用将有效改善采后柑橘绿霉菌防治不力的局面,而且,多种药剂的轮换使用也将有效的减少 DMIs 抗性菌系的比例。因此,建议有关部门应尽快启动筛选和登记新的采后柑橘防腐处理杀菌剂。

## 参考文献

- [1] Kanetis L, Förster H, Adaskaveg J E. Comparative efficacy of the new postharvest fungicides azoxystrobin, fludioxonil, and pyrimethanil for managing citrus green mold[J]. *Plant Disease*, 2007, 91: 1502–1510.
- [2] Li H Y. Illustrations of occurrence and prevention of citrus disease in color (in Chinese) [M]. Beijing: China Agriculture Press (北京: 中国农业出版社), 2010
- [3] Eckert J W. *Penicillium digitatum* biotypes with reduced sensitivity to imazalil [J]. *Phytopathology*, 1987, 77: 1728.
- [4] Bus V G, Bongers A J, Risse L A, et al. Occurrence of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* resistant to benomyl, thiabendazole, and imazalil on citrus fruit from different geographic origins [J]. *Plant Disease*, 1991, 75: 1098–1100.
- [5] Feng D. Resistance level and mechanism of *Penicillium digitatum* from Quzhou, Zhejiang to imazalil and carbendazim (in Chinese) [D]. Zhejiang: Zhejiang University (浙江: 浙江大学), 2011.
- [6] Sánchez-Torres P, Tuset J J. Molecular insights into fungicide resistance in sensitive and resistant *Penicillium digitatum* strains infecting citrus [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2011, 59: 159–165.
- [7] Li H Y, Xie Q Y, Song A H. Sequence comparison of



- CYP51 genes between imazalil-sensitive and imazalil-resistant strains of *Penicillium digitatum* (in Chinese) [J]. *Mycosystema*(菌物系统), 2003, 22(1): 153 – 156.
- [8] Ghosop J M , Schmidt L S, Smilanick J L, *et al.* Imazalil resistance linked to a unique insertion sequence in the PdCYP51 promoter region of *Penicillium digitatum*[J]. *Postharvest Biol. Technol.* , 2007, 44: 9 – 18.
- [9] Chen G J, Zhang Z F, Li H Y, *et al.* Real-time PCR assay for detection of the frequency of imazalil-resistance of *Penicillium digitatum* (in Chinese) [J]. *Acta Phytopathologica Sinica* (植物病理学报), 2008, 38(6): 561 – 569.
- [10] Sun X P, Wang J Y, Li H Y, *et al.* PdCYP51B, a new putative sterol 14-demethylase gene of *Penicillium digitatum* involved in resistance to imazalil and other fungicides inhibiting ergosterol synthesis [J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* , 2011, 91: 1107 – 1119.
- [11] Hamamoto H, Hasegawa K, Nakaune R, *et al.* Tandem repeat of a transcriptional enhancer upstream of the sterol 14 $\alpha$ -demethylase gene (CYP51) in *Penicillium digitatum*[J]. *Appl. Environ. Microbiol.* , 2000, 66(8): 3421 – 3426.
- [12] Liu W, Sun Y, Li R Y, *et al.* The T788G mutation in the *cyp51C* gene confers voriconazole resistance in *Aspergillus flavus* causing aspergillosis[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2012, 56(5): 2598 – 2603.
- [13] Eckert J W, Sievert J R, and Ratnayake M. Reduction of imazalil effectiveness against citrus green mold in California packinghouses by resistant biotypes of *Penicillium digitatum* [J]. *Plant Dis.* 1994, 78: 971 – 974.
- [14] Jiang L Y, Chen G Q, Li H Y, *et al.* Efficacy of pyrimethanil in controlling green mould of postharvest citrus (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Pesticide Science*(农药学报), 2010, 12(2): 149 – 1454.
- [15] Holloman D W ,Butters J A, Barker H, *et al.* Fungal  $\beta$ -tubulin, expressed as a fusion protein, binds benzimidazole and phenylcarbamate fungicides [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , 1998, 42(9): 2171 – 2173.
- [16] Holmes G J, Eekert J W. Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to Postharvest citrus fungicides in California [J]. *Phytopathology*, 1999, 89: 716 – 721.
- [17] Kinay P, Gabler F M, Smilanick J L, *et al.* Characterization of fungicide-resistant isolates of *Penicillium digitatum* collected in California[J]. *Crop Protection* , 2007, 26: 647 – 656
- [18] Ausubel F M. Short protocols in molecular biology (in Chinese) [M]. Beijing: Science Press (北京: 科学出版社), 2008.
- [19] Smilanick J L, Mansour M F, Margosan D A, *et al.* Influence of pH and NaHCO<sub>3</sub> on effectiveness of imazalil to inhibit germination of *Penicillium digitatum* and to control postharvest green mold on citrus fruit [J]. *Plant Dis.* , 2005, 89: 640 – 648.
- [20] Holmes G J, Eckert J W. Relative fitness of imazalil-resistant and-sensitive biotypes of *Penicillium digitatum* [J]. *Plant Dis.* , 1995, 79:1068 – 1073.
- [21] Kanetis L, Forster H, Jones C A , *et al.* Characterization of genetic and biochemical mechanisms of fludioxonil and pyrimethanil resistance in Field isolates of *Penicillium digitatum*[J]. *Phytopathology*, 2008, 98: 205 – 214.