

·研究简报·

浙江省柑橘绿霉病菌对啞菌酯的敏感性研究

张志芳, 吴可嘉, 李红叶*

(浙江大学 农业与生物技术学院 生物技术研究所, 杭州 310029)

摘要:采用孢子萌发法和生长速率法测定了 2000~2006年间采自浙江衢州、杭州、金华、丽水的 65个柑橘绿霉病菌 *Penicillium digitatum* 菌株对啞菌酯的敏感性。结果表明:啞菌酯对供试菌株孢子萌发和菌丝生长的 EC_{50} 值均呈单峰分布,分别介于 0.020 1~0.260 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 0.005 3~0.079 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间,平均值分别为 0.042 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 0.025 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。敏感性频次分析结果表明,该 65个菌株孢子萌发和菌丝生长对啞菌酯的敏感性频率分布均符合正态分布,其 EC_{50} 平均值 0.042 6 \pm 0.030 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 0.025 0 \pm 0.012 9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 可分别作为柑橘绿霉病菌孢子萌发和菌丝生长对啞菌酯的敏感基线。

关键词:柑橘绿霉病菌 *Penicillium digitatum*; 啞菌酯; 有效中浓度; 敏感基线

中图分类号: S481.4

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2008)03-0375-04

Sensitivisty of *Penicillium digitatum* in Zhejiang to the Strobilurin Fungicide Azoxystrobin

ZHANG Zhi-fang, WU Ke-jia, LI Hong-ye*

(College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: Sixty-five isolates of *Penicillium digitatum* were collected from Quzhou, Hangzhou, Jinhua and Lishui in Zhejiang Province during 2000 to 2006, where strobilurin fungicide azoxystrobin had never been used to control green mold of postharvest citrus. The sensitivities of the isolates to azoxystrobin were assayed by the methods of conidial germination and mycelial linear growth. The results demonstrated that the EC_{50} values for conidial germination and mycelial growth ranged from 0.020 1 to 0.260 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 0.005 3 to 0.079 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and averaged 0.042 6 and 0.0250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. The frequency distributions of EC_{50} values of the 65 isolates were normally distributed for both conidial germination and mycelial growth. Thus, the mean EC_{50} values 0.042 6 \pm 0.030 4 and 0.025 0 \pm 0.012 9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of the 65 isolates could be used as the sensitivity baselines for conidial germination and mycelial growth of *P. digitatum* to azoxystrobin, respectively.

Key words: *Penicillium digitatum*; azoxystrobin; EC_{50} ; sensitivity baseline

由指状青霉菌 *Penicillium digitatum* 引起的柑橘绿霉病是柑橘采后贮藏、运输期间发生最普遍、最严重的病害,目前该病害仍然以化学防治为主。继噻菌灵 (thiabendazole, TBZ) 和邻苯基苯酚钠

(SOPP) 控制柑橘绿霉病在某些地方失效后^[1,2], 咪唑类杀菌剂抑霉唑 (imazalil) 的防治效果也不容乐观,抗性问题的美国、以色列、日本和我国均相继出现^[3-6]。因此,筛选高效、低毒、低残留的新

收稿日期: 2008-03-28; 修回日期: 2008-04-15.

作者简介: 张志芳 (1983), 女, 辽宁人, 硕士研究生, E-mail: zhifangzhang1983@sina.com; *通讯作者 (Author for correspondence): 李红叶 (1963-), 女, 浙江人, 博士生导师, 从事植物病理学研究. 联系电话: 0571-86971328; E-mail: hyl@zju.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (30571236); 国家高技术研究发展计划 ("863" 计划) (2007AA102422); 现代农业产业 (柑橘) 技术体系 (MATS) 专项经费.

型杀菌剂是保证采后柑橘安全所面临的课题。

嘧菌酯 (azoxystrobin) 是第一个登记注册的甲氧基丙烯酸酯类 (QoIs) 杀菌剂, 主要作用于线粒体内膜上的复合体, 与细胞色素 b (cytb) 的 Q_o 位点结合, 抑制细胞色素 b 和 c₁ 间的电子传递, 干扰能量形成而起到杀菌作用^[7]。这类杀菌剂既能抑制真菌菌丝生长, 又能抑制孢子形成和萌发, 不仅杀菌谱广, 还兼具有对非靶标生物和环境安全, 与甾醇合成抑制剂类 (sterol inhibitors)、苯酰胺类 (phenylamides)、二甲酰亚胺类 (dicarboximides) 和苯并咪唑类 (benzimidazoles) 杀菌剂无交互抗性等优点^[7]。但是这类杀菌剂作用位点单一, 靶标位点自发突变频率较高, 在高选择压力下, 病原菌极易产生抗药性群体, 田间抗性在多个植物病原菌中已被证实^[8-11]。

嘧菌酯对柑橘绿霉病的防治效果已得到肯定, 在美国已获登记用于采后柑橘防腐^[12-14], 在我国, 用嘧菌酯对采后柑橘进行防腐处理尚处于试验阶段。浙江省是我国柑橘生产大省, 是椪柑 *Citrus poonensis* Hort 的主要产地。在推广应用嘧菌酯之前, 了解我国浙江省柑橘绿霉病菌群体对嘧菌酯的敏感性水平, 确定其敏感基线, 对该药剂推广后开展病菌抗药性早期监测, 及早提出药剂的科学使用方法和抗药性治理方案具有一定的现实意义。

1 材料与方 法

1.1 菌株和药剂

2000~2006年间, 从浙江省杭州、衢州、金华、丽水农户柑橘贮藏库房随机采集柑橘绿霉病菌果, 经组织分离和单孢纯化, 共获得柑橘绿霉病菌菌株 65 个, 其中杭州 2000 年菌株 (PDHz) 9 个, 2005 年菌株 2 个; 衢州 2005 年菌株 (PDQz) 13 个, 2006 年菌株 33 个; 金华 2005 年菌株 (PDJh) 6 个; 丽水 2005 年菌株 (PDLs) 2 个。以上菌株均置于 PDA 培养基斜面于 4℃ 冰箱中保存。

250 g/L 嘧菌酯 (azoxystrobin) 水乳剂, 由先正达公司提供, 99% 水杨基羟肟酸 (salicylhydroxamic acid, SHAM), 购自 Sigma 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 孢子萌发最佳观察时间的确定 从杭州、

衢州、金华、丽水各地菌株中各随机选取一个柑橘绿霉病菌菌株, PDA 培养基培养 5 d, 经无菌水洗脱, 分别配制成浓度约为每 mL 含 1×10^5 个孢子的孢子悬浮液, 吸取 50 μ L 涂在含 100 μ g/mL SHAM 的 PDA 培养基平板上, 25℃ 培养, 每隔 2 h 在显微镜下观察并记录萌发与未萌发的孢子数 (总数不低于 200 个, 以芽管长度超过孢子宽度视为萌发), 计算孢子萌发率。每处理 (每菌株、每药剂浓度) 重复 3 次, 以平均萌发率为纵坐标、观察时间为横坐标, 绘制孢子萌发时间曲线图, 确定孢子萌发抑制试验的最佳观察时间。

1.2.2 孢子萌发对嘧菌酯的敏感性测定 将供试药剂配成 0.25 mg/mL 的母液, 取其适量与约 50 的 PDA 培养基混匀, 制成嘧菌酯终浓度分别为 0 (对照)、0.010、0.015、0.030、0.045、0.060、0.075、0.100 μ g/mL 的含药平板, 同时在各浓度 (包括对照) 培养基中添加 SHAM, 使其终浓度达到 100 μ g/mL, 以抑制真菌旁路氧化作用。按 1.2.1 节方法配制每 mL 含 1×10^5 个孢子的孢子悬浮液, 吸取 50 μ L 分别涂在含系列浓度嘧菌酯的平板上, 25℃ 培养 14 h 后, 显微镜下观察并记录孢子萌发数和未萌发数, 计算各浓度下孢子萌发抑制率, 每处理重复 3 次, 每重复观察记录的孢子数不低于 200 个。

1.2.3 菌丝对嘧菌酯的敏感性测定 将 100 μ L 浓度为每 mL 含 1×10^5 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, 接种在含上述系列浓度嘧菌酯的 PDA 平板中央, 25℃ 下培养 7 d, 十字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。

1.3 数据处理

孢子萌发率、孢子萌发抑制率和菌丝生长抑制率分别按公式 (1)、(2)、(3) 计算, 以浓度对数 (X) 与抑制百分率的机率值 (Y), 用 DPS 统计软件求取嘧菌酯对柑橘绿霉病菌的毒力回归方程及有效中浓度 EC₅₀ 值, 并用 DPS 作正态分布检验。根据野生敏感性病原群体对药剂敏感性为正态分布的原理, 当 EC₅₀ 值处于正态分布时, 孢子萌发法和生长速率法测得的各自 EC₅₀ 平均值即分别为其对嘧菌酯的敏感基线。

$$\text{孢子萌发率} (\%) = \frac{\text{孢子萌发数}}{\text{观察孢子总数}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{孢子萌发抑制率}(\%) = (1 - \frac{\text{药剂处理孢子萌发率}}{\text{对照孢子萌发率}}) \times 100 \quad (2)$$

$$\text{菌丝生长抑制率}(\%) = (1 - \frac{\text{药剂处理菌落直径} - 5 \text{ mm}}{\text{对照菌落直径} - 5 \text{ mm}}) \times 100 \quad (3)$$

2 结果与分析

2.1 柑橘绿霉病菌孢子萌发时间曲线

供试菌株的孢子萌发动态试验结果表明, 25 下培养 6 h 后可见少量孢子萌发, 其后孢子萌发率随时间的推移而迅速上升, 经 14 h, 各菌株的孢子萌发率均大于 90%, 且差异不显著 (5% 显著水平)。但此后孢子萌发率随培养时间的延长增加缓慢 (图 1)。考虑到时间的进一步延长会导致芽管的延伸过长, 会给观察带来较大的难度, 故将 25 下培养 14 h 作为孢子对啞菌酯敏感性测定的观察时间。

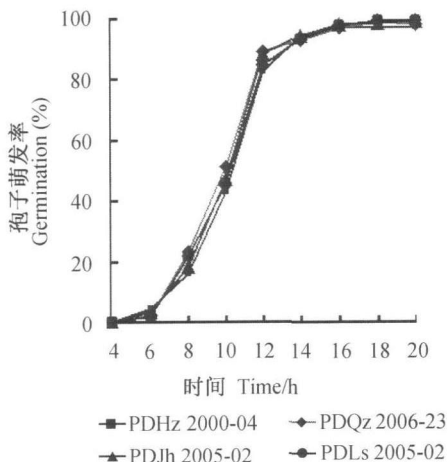


图 1 柑橘绿霉菌孢子萌发时间曲线

Fig. 1 Time course of conidial germination of *Penicillium digitatum*

2.2 柑橘绿霉病菌孢子对啞菌酯的敏感性

采用孢子萌发法测定了供试的 65 个柑橘绿霉病菌单孢菌株对啞菌酯的敏感性, 结果表明, 啞菌酯对柑橘绿霉病菌孢子萌发的 EC_{50} 值均低于 0.3 $\mu\text{g/mL}$, 最低为 0.0201 $\mu\text{g/mL}$ ($Y = 3.8256x + 11.4900, R^2 = 0.9503$), 最高 0.2600 $\mu\text{g/mL}$ ($Y = 4.5481x + 12.2100, R^2 = 0.9663$), 平均为 0.0426 $\mu\text{g/mL}$, 相差 12.9 倍。其 EC_{50} 值经过倒数转换后, 经 DPS 统计软件分析显示: 5% 显著水平, 卡方值 $\chi^2 = 7.8424, df = 7, P = 0.3467, P > 0.05$, 表明 65 个菌株孢子萌发对啞菌酯不同敏感性菌株的频率分布符合正态分布 (图 2), 说明其

平均值 0.0426 \pm 0.0304 $\mu\text{g/mL}$ 可作为柑橘绿霉病菌孢子萌发对啞菌酯的敏感基线。

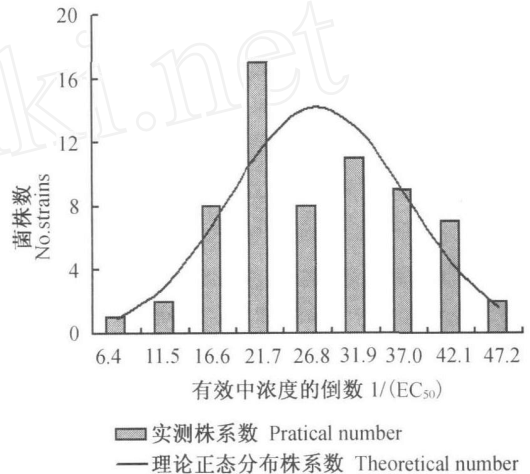


图 2 柑橘绿霉病菌孢子萌发对啞菌酯敏感性频次分布图

Fig. 2 Sensitivity distribution of conidial germination of *P. digitatum* isolates to azoxystrobin

2.3 柑橘绿霉病菌菌丝对啞菌酯的敏感性

采用菌丝生长法测定了供试的 65 个柑橘绿霉病菌菌株对啞菌酯的敏感性, 结果表明, 啞菌酯对柑橘绿霉病菌孢子萌发的 EC_{50} 值均低于 0.1 $\mu\text{g/mL}$, 最低为 0.0053 $\mu\text{g/mL}$ ($Y = 0.6880x + 6.5657, R^2 = 0.9289$), 最高 0.0794 $\mu\text{g/mL}$ ($Y = 0.9792x + 6.0773, R^2 = 0.9120$), 平均为 0.0250 $\mu\text{g/mL}$, 相差 15.0 倍。其 EC_{50} 值经过对数转换后, 经 DPS 软件分析显示: 5% 显著水平, 卡方值 $\chi^2 = 13.7215, df = 7, P = 0.05636, P > 0.05$, 表明 65 个菌株菌丝生长对啞菌酯不同敏感性菌株的频率分布符合正态分布 (图 3), 说明其平均值 0.0250 \pm 0.0129 $\mu\text{g/mL}$ 可作为柑橘绿霉病菌菌丝生长对啞菌酯的敏感基线。

3 结论和讨论

本研究是在离体条件下测定了来自浙江省未使用过 QoIs 杀菌剂地区的 65 个柑橘绿霉病菌菌株孢子萌发和菌丝生长对啞菌酯的敏感性, 发现其 EC_{50} 平均值分别为 0.0426 \pm 0.0304 和 0.0250 \pm 0.0129 $\mu\text{g/mL}$, 说明自然界中柑橘绿霉

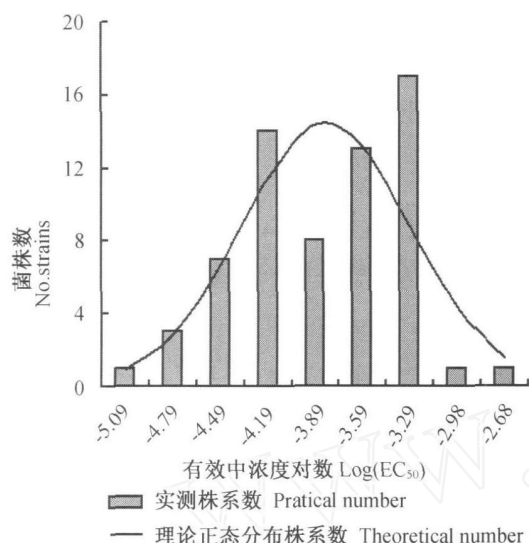


图 3 柑橘绿霉病菌菌丝生长对啞菌酯敏感性频次分布

Fig. 3 Sensitivity distribution of mycelial growth of *P. digitatum* isolates to azoxystrobin

病菌对啞菌酯尚处于非常敏感的水平。但是,两者 EC_{50} 值跨越的范围较大(图 2和 3),敏感性最低菌株的抗性系数分别是敏感性最高菌株的 12.9倍和 15.0倍。这一结果表明,柑橘绿霉病菌自然种群对啞菌酯的敏感性存在较大的差异。

已有的研究表明,病原真菌对啞菌酯等 Q_o Is 杀菌剂抗药性的产生与其细胞色素 b 基因所编码蛋白的 143 位 (G143A) 和 129 位 (F129L) 密码子的点突变有关,前者突变所产生的抗性都为高抗,而后者相对较低,而且抗性菌株的适应性并没有下降^[8,15]。本研究结果表明,2006 年采自衢州的孢子萌发敏感性和 2005 年采自衢州的菌丝生长敏感性最低。

在我国,啞菌酯等 Q_o Is 杀菌剂已普遍应用于多种作物的白粉病、霜霉病和炭疽病等病害的防治^[16~18],虽然目前还未见有关上述病菌对该药剂产生田间抗药性的报道,但据科技人员反映,连续使用该药剂后,其防效已明显下降或失效。因此在这类杀菌剂开始推广用于防治柑橘绿霉病病害之前,建立柑橘绿霉病菌对啞菌酯的敏感性基线,对评估啞菌酯的抗药性风险、制定科学的用药方案、及时监测田间病原菌抗药性产生以及抗性种群变化动态提供了有价值的参考数据。

参考文献:

[1] KNAY P, MANSOUR M F, GABLER F M, et al Characterization of Fungicide-resistant Isolates of *Penicillium*

digitatum Collected in California [J]. *Crop Protect*, 2007, 26: 647-656.

[2] SCHMIDT L S, GHOSOPH J M, MARGOSAN D A, et al Mutation at α -Tubulin Codon 200 Indicated Thiabendazole Resistance in *Penicillium digitatum* Collected from California Citrus Packinghouses [J]. *Plant Dis*, 2006, 90: 765-770.

[3] 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 Dis*, 1991, 75: 1098-1100.

[4] BUS V G. Levels of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* with Reduced Sensitivity to Thiabendazole, Benomyl and Imazalil [J]. *Postharvest Biol Technol*, 1992, 1: 305-315.

[5] HAMAMOTO H, HASEGAWA K, NAKAUNE R, et al Tandem Repeat of a Transcriptional Enhancer Upstream of the Sterol 14-Demethylase (CYP51) in *Penicillium digitatum* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66: 3421-3426.

[6] ZHU J W, XIE Q Y, LI H Y. Occurrence of Imazalil-resistant Biotype of *Penicillium digitatum* in China and the Resistant Molecular Mechanism [J]. *J Zhejiang Univ, Science A*, 2006, 7 (Suppl): 362-365.

[7] BARTLETT D W, CLOUGH J M, GODWIN J R, et al The Strobilurin Fungicides [J]. *Pest Manag Sci*, 2002, 58: 649-662.

[8] MA Z H, MICHALIDES T J. Advances in Understanding Molecular Mechanisms of Fungicide Resistance and Molecular Detection of Resistant Genotypes in Phytopathogenic Fung [J]. *Crop Protect*, 2005, 24: 853-863.

[9] SIERTZKI H, WULLSCHLEGER J, GISI U. Point Mutation in Cytochrome b Gene Conferring Resistance to Strobilurin Fungicides in *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* Field Isolates [J]. *Pestic Biochem Physiol*, 2000, 68: 107-112.

[10] LUO Y, MA Z H, REYES H C, et al Using Real-time PCR to Survey Frequency of Azoxystrobin-resistant Allele G143A in *Alternaria* Populations from Almond and Pistachio Orchards in California [J]. *Pestic Biochem Physiol*, 2007, 88: 328-336.

[11] SHIH H, FRAAJE B A, SUGIYAMA T, et al Occurrence and Molecular Characterization of Strobilurin Resistance in *Cucumber Powdery Mildew* and *Downy Mildew* [J]. *Phytopathol*, 2001, 91: 1166-1171.

[12] ZHANG J X. The Potential of a New Fungicide Fludioxonil for Stem-end Rot and Green Mold Control on Florida Citrus Fruit [J]. *Postharvest Biol Tech*, 2007, 46 (3): 262-270.

[13] KANETIS L, FORSTER H, ADASKAVEG J E Comparative Efficacy of the New Postharvest Fungicides Azoxystrobin, Fludioxonil and Pyrimethanil for Managing Citrus Green Mold [J]. *Plant Dis*, 2007, 91: 1502-1511.

[14] ZHANG J X, TAMMER L W. Preharvest Application of Fungicides for Postharvest Disease Control on Early Season Tangerine Hybrids in Florida [J]. *Crop Protect*, 2007, 26: 886-893.

[15] GRASSO V, PALERMO S, SIERTZKI H, et al Cytochrome b Gene Structure and Consequences for Resistance Q_o Inhibitor Fungicides in Plant Pathogens [J]. *Pest Manag Sci*, 2006, 62: 465-472.

[16] QIAN Zhong-hai (钱钟海), CHEN Chang-jun (陈长军), WANG Jian-xin (王建新), et al 辣椒疫霉 *Phytophthora capsici* Leonian 不同发育阶段对啞菌酯的敏感性研究 [J]. *Acta Phytopathol Sinica (植物病理学学报)*, 2006, 36 (4): 322-327.

[17] LI Hong-xia (李红霞), LIU Zhao-yun (刘照云), WANG Jian-xin (王建新), et al 辣椒炭疽病菌对啞菌酯的敏感性测定 [J]. *Acta Phytopathol Sinica (植物病理学学报)*, 2005, 35 (1): 73-77.

[18] HAN Xiu-ying (韩秀英), MA Zhi-qiang (马志强), LI Hong-xia (李红霞), et al 黄瓜霜霉病菌对啞菌酯的敏感基线研究 [J]. *Chin J Pestic Sci (农药学报)*, 2004, 6 (2): 76-79.

(Ed JIN S H)