

芒果炭疽病菌对多菌灵的抗药性

詹儒林¹ 李 伟² 郑服丛^{2*}

(1. 中国热带农业科学院南亚热带作物研究所, 湛江 524091; 2. 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所, 儋州 571737)

摘要: 对来自广东和海南等不同果园的芒果炭疽病菌进行了对多菌灵的抗性测定。结果表明, 敏感菌株的最小抑制浓度(MIC)为 $0.110\mu\text{g/mL}$, 而抗性菌株在多菌灵 $500\mu\text{g/mL}$ 下仍生长良好。抗性菌株经继代培养10代后抗性几乎不变, 说明其抗性稳定。对抗、感菌株的生物学特性进行测定, 然后以产孢量和致病力分别用MIC做简单相关性分析, 证明病菌的生物学特性、产孢量、致病力与抗药性无关, 因此可以认为病菌对多菌灵的抗药性突变并不影响其正常的生理功能。抗性菌株对甲基硫菌灵、苯菌灵、噻菌灵表现正交互抗性, 而对乙霉威和咪鲜胺敏感。病菌在含药培养基上测定的敏感性与在经多菌灵处理过的离体果实上的敏感性有较好的对应关系, 可用于大田抗药性的初步检测。

关键词: 芒果炭疽病菌; 多菌灵; 抗药性

芒果炭疽病是芒果的严重病害, 其病原菌为 *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., 属半知菌纲。可引起芒果花、叶和果实的掉落, 其潜伏菌使采后果实变黑腐烂, 严重影响果实的产量及品质。多菌灵(carbendazim)、甲基硫菌灵(thiophanate-methyl)、苯菌灵(benomyl)、噻菌灵(thiabendazole)等苯并咪唑类杀菌剂对该病害具有很好的控制作用, 后3种药剂与病菌相互作用后都会产生共同的衍生物多菌灵或它的乙基同系物乙基多菌灵^[1]。多菌灵与敏感菌株的微管蛋白有高度的亲和力, 它束缚微管蛋白亚基, 使微管的形成受阻, 不能正常组装到有丝分裂过程中起重要作用的纺锤丝, 破坏细胞有丝分裂, 最终表现为杀菌作用^[2~5]。多菌灵对芒果采前炭疽病的防效可达67.6%^[6]; 用含有苯菌灵850mg/mL的温水(52°C ~ 55°C)处理采后果实10min可有效抑制炭疽病的发生^[7]。但是, 频繁使用此类杀菌剂会导致芒果炭疽病菌产生抗药性。对许多真菌来说, 抗药性的形成与病菌 β -微管蛋白基因变异有关, 属单基因突变, 由这一单基因控制的抗药性机制极易引起病菌产生抗药性, 还会引发交互抗性^[8~11]。

炭疽病菌对杀菌剂产生抗药性的现象在国外早有报道。de Lapeyre de Bellaire等报道了香蕉炭疽病菌 *C. musae* 对噻菌灵的抗药性^[12]。Spalding在芒果炭疽菌中筛选到了能耐受 $100\mu\text{g/mL}$ 苯菌灵的抗性菌株, 并对噻菌灵、甲基硫菌灵等杀菌剂具有正交互抗性^[13]。

我国关于芒果炭疽病的抗药性问题尚未研究清楚。在芒果炭疽病的防治中发现, 有些果园使用的多菌灵药效显著下降, 使用浓度不断加大, 有的甚至失效, 似乎已经出现了抗药性问题。为了弄清上述问题, 我们开展了芒果炭疽病菌对多菌灵的田间抗药性测定, 以期科学有效地治理此病害及抗药性监测提供毒理学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试药剂

99%多菌灵、94%甲基硫菌灵、98%苯菌灵、98%噻菌灵、90.4%乙霉威(diethofencarb)等杀菌剂原药和45%咪鲜胺(prochloraz)乳油。

1.1.2 供试菌株

基金项目: 农业部农业结构调整重大技术研究专项项目(2002-15-01A)

作者简介: 詹儒林, 男, 1968年生, 助理研究员, 主要研究方向为分子植物病理学(E-mail: zhanrulin555@163.com)

* 通讯作者(E-mail: zwbhyjs@public.dzptt.hi.cn)

收稿日期: 2004-02-12

用五点采样法从广东省湛江市的一个长期使用多菌灵(以多菌灵和甲基硫菌灵为主)的芒果园、海南省儋州市很少使用多菌灵和海口市多菌灵使用情况不明的芒果园分别采集表现炭疽病症状的芒果叶片或果实,用 PA 培养基分离,单孢纯化,按照柯赫氏法则确证其是芒果炭疽病病原菌。从每一个田间采集的病样分离到的病原菌为一个菌株。所有菌株均于 PDA 试管斜面上保存备用。来自湛江、儋州和海口的菌株分别以“Z”、“D”、“H”开头编号,若为抗性菌株加“R”,敏感菌株加“S”。

1.2 方法

1.2.1 供试药剂母液及含药培养基的制备

将 99% 多菌灵溶解于盐酸,94% 甲基硫菌灵、98% 苯菌灵和 98% 噻菌灵溶于甲醇,90.4% 乙霉威溶于丙酮,45% 咪鲜胺溶于无菌水,分别溶解后配成 10000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的母液;然后按试验所需的药剂处理浓度,吸取相应体积的母液分别加入灭菌的 PDA 培养基中,混合均匀后倒入培养皿中制成含药培养基平板。

1.2.2 在培养基平板上供试菌株对多菌灵的敏感性初步测定

参照 Spalding 的方法^[13]及其对芒果炭疽病菌在含药培养基上的敏感性测定结果,将待测菌株置于分别含多菌灵 0.5、10、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PDA 平板上进行敏感性初步测定。具体方法:供试菌株活化培养 7 天后,用打孔器在菌落边缘打取菌块(直径 5mm,下同),移接于上述含不同多菌灵浓度的 PDA 培养基中,每菌株每浓度 3 皿。培养 4 天后以交叉法测量菌落直径,测量结果减去移接菌块的直径。

1.2.3 对多菌灵敏感基线(minimal inhibitory concentration, MIC)及抗药性水平测定

把在多菌灵 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 下受完全抑制的菌株进一步进行对多菌敏感基线的测定;把在 20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 下仍能生长的菌株进一步进行对多菌灵的抗性测定。按 1.2.2 的方法,把属于前者的待测菌株分别置于含多菌灵 0(CK)、0.05、0.07、0.09、0.11、0.13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PDA 平板上培养,属于后者的菌株置于含多菌灵 0(CK)、5、20、50、100、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PDA 平板上培养。每菌株 2 皿,重复 3 次。培养 4 天后以交叉法测量菌落直径,测量结果扣除移接菌块的直径。

1.3 不同菌株的菌落、分生孢子形态、产孢量、菌落生长速度和致病力测定

将病菌在 PDA 上培养 4 天,观察菌落形态和颜色,然后每皿倒入 10mL 无菌水,用灭菌的三角涂棒刮下分生孢子,在显微镜下观察分生孢子的形态和用血球计数器计算其数量。每菌株测定 3 皿,取平均值。

待测菌株于 PDA 平板上培养 7 天,取菌落边缘菌块,移接于 PDA 平板上,分别于第 3、4、5 天测量菌落直径,计算每天菌落直径增长量,取平均值。每菌株 2 皿,3 次重复。

取已培养 7 天的待测菌株的菌落边缘菌块紧贴于用针刺创伤的芒果果实伤口上。芒果品种为红象牙(感病品种),各果实成熟度基本一致,除针刺创伤外,其它正常。每菌株接种 2 个果,每果接种 5 点,3 次重复,以接琼脂培养基为对照。保湿 24h 后解除保湿条件,5 天后检查发病率和用交叉测量法测量病斑直径,计算发病率和病情指数。所有操作在室温 26~29 $^{\circ}\text{C}$ 进行。

1.4 抗、感菌株的产孢量、致病力与 MIC 的简单相关性分析

随机选取部分抗性菌株和敏感菌株,如 MIC 大于 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以及 MIC 为 0.11 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或 0.13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的菌株,以其产孢量、致病力分别与 MIC 进行简单相关性分析。

1.5 抗性菌株的稳定性测定

从 Z 类菌系中随机选取一部分抗性菌株在 PDA 上培养 5 天,挑取分生孢子转接到 PDA 培养基上再培养,如此继代培养 10 代后,按 1.2.2 的移接方法,将菌块转接到含多菌灵 0(CK)、5、20、50、100、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PDA 平板上,每菌株每浓度 3 皿。

1.6 杀菌剂的交互抗药性测定

分别配制含 0.1、10、1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的多菌灵、甲基硫菌灵、苯菌灵和噻菌灵及含 0.05、0.1、0.5、10、100、1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的乙霉威和咪鲜胺 PDA 平板。随机选取一个在多菌灵 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 下仍生长良好的抗性菌株做交互抗药性测定,每浓度接菌块 3 皿,培养 4 天后测量菌落直径,求平均值。

1.7 病菌在离体芒果果实上对多菌灵的敏感性测定

芒果果实用 52~55 $^{\circ}\text{C}$ 的多菌灵水溶液 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浸泡 10min,晾干后用 1.3 的方法接

种供试菌株。对照不加多菌灵,其它条件一致。5天后检查发病率和用交叉测量法测量病斑直径,计算发病率和病情指数。所有操作在室温 26 ~ 29℃ 进行。

2 结果与分析

2.1 病菌在培养基上对多菌灵的敏感性

表 1 说明,在多菌灵 20μg/mL 下仍能存活的菌株中,湛江和海口菌系中所含比例分别达 53.1% 和 40.7%,而儋州菌系中只有 10.0%;在多菌灵 10μg/mL 下也有类似的结果。说明了芒

果炭疽病菌在广东湛江和海南海口地区已形成了对多菌灵高频率的抗药性。

敏感基线测定表明,敏感菌株如 DS33 的 MIC 为 0.110μg/mL,大部分的 MIC 小于 0.130μg/mL,EC₉₀在 0.077μg/mL 至 0.174μg/mL 之间(表 2);而抗性菌株如 ZR64 在多菌灵 500μg/mL 下仍生长良好(图 1-上),其 MIC 大于 500μg/mL,而随机选取的作为参照的敏感菌株如 HS19 在 5μg/mL 下便受到了完全抑制(图 1-下,此菌株未作 MIC 测定)。对比敏感菌株与抗性菌株的 MIC 值可知,抗性菌株的抗性水平达 5000 倍以上。

表 1 不同来源的芒果炭疽病菌株在不同浓度的多菌灵培养基上能生长的菌株比例
Table 1 Percentage of *C. gloeosporioides* isolates with growing capacity under different carbendazim stress

菌株来源 Origin	菌株数量 Number of isolate	多菌灵胁迫下可生长菌株百分率(%) Percentage of isolate with growing capacity under carbendazim stress		
		0.5μg/mL	10μg/mL	20μg/mL
湛江 Zhanjiang(Z)	64	59.4	54.7	53.1
儋州 Danzhou(D)	80	32.5	11.3	10.0
海口 Haikou(H)	59	42.4	42.4	40.7

注:Z 菌系来自广东湛江市的一个使用多菌灵 15 年以上的果园;D 菌系来自海南儋州市一个很少使用多菌灵的果园;H 菌系来自海南海口市多菌灵使用情况不明的果园。Note: "Z", isolates from mango orchard in Zhanjiang City, Guangdong Province, where carbendazim had been used for more then 15 years; "D", isolates from mango orchard at Danzhou City, Hainan Province, where carbendazim was seldom applied; "H", isolates from mango orchards at Haikou City, Hainan Province, where the situation of carbendazim application unknown.

表 2 不同来源的芒果炭疽病菌株对多菌灵的敏感性
Table 2 Sensitivity of *C. gloeosporioides* isolates of different origins to carbendazim

菌株 Isolates	来源 Origins of isolates	最低抑制浓度(μg/mL) MIC	EC ₅₀ (μg/mL)	EC ₉₀ (μg/mL)
ZS44	湛江 Zhanjiang	0.130	0.053	0.092
ZS69	湛江 Zhanjiang	0.130	0.058	0.099
ZS23	湛江 Zhanjiang	0.130	0.055	0.105
ZS19	湛江 Zhanjiang	0.110	0.058	0.091
HS42	海口 Haikou	—	0.057	0.121
HS60	海口 Haikou	0.130	0.046	0.076
DS37	儋州 Danzhou	—	0.068	0.174
DS27	儋州 Danzhou	0.130	0.047	0.077
DS33	儋州 Danzhou	0.110	0.055	0.087

2.2 抗、感菌株的生物学特性、致病力的比较

形态学特征观察结果表明,抗、感菌株的菌落均表现为圆形,边缘整齐,有些出现同心环纹,气生菌丝灰白,多数菌株产生粉红色孢子堆;分生孢

子均为圆筒形,大小 10 ~ 25μm × 3 ~ 4.5μm。抗、感菌株的菌落生长速度均无显著性差异,而在产孢量和致病力中出现了极显著性差异,但抗、感菌株可同时出现在致病力较强(或弱)的菌株中,产

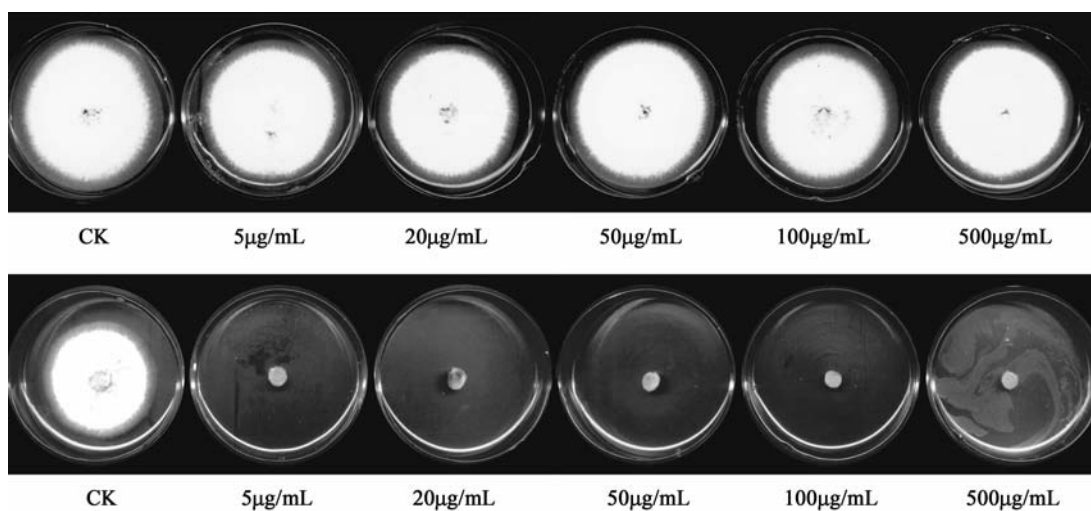


图1 抗性菌株 ZR64 (上)和敏感菌株 HS19(下)在多菌灵各浓度下的菌落生长情况

Fig. 1 Colony of resistant isolate ZR64 (top) and sensitive isolate HS19 (bottom) on PDA medium with different carbendazim dosages

孢量的情况也一样。以上结果表明,抗性菌株的生物学特性、产孢能力和致病力并没有特异性。

抗性和敏感菌株的 MIC 与产孢量、MIC 与致病力的相关系数分别为 0.49233 和 -0.31302 ,显著性测验均不显著。表明病菌的抗药性与产孢能力和致病力无关。

2.3 抗性菌株的遗传稳定性

供试菌株在无药培养基继代培养 10 代后,在含多菌灵 $500\mu\text{g}/\text{mL}$ 的平板上生长良好,与第 2 代相比变化不大,如菌株 ZR64 在 $500\mu\text{g}/\text{mL}$ 下第 2 代和第 10 代的抑菌率分别为 4.4% 和 6.7%。表明抗性菌株的抗性稳定。

2.4 交互抗性

抗性菌株 ZR64 在含多菌灵、甲基硫菌灵、苯菌灵或噻菌灵 $1000\mu\text{g}/\text{mL}$ 的平板上均能正常生长,抑菌率只在 4.2% 至 12.5% 之间,表明芒果炭疽病菌的抗性菌株对这类作用机制相似的杀菌剂存在正交互抗性。而对不同作用机制的乙霉威和咪鲜胺的 MIC 分别为 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $0.5\mu\text{g}/\text{mL}$,表现正常的敏感性。

2.5 病菌在离体芒果果实上对多菌灵的敏感性

敏感菌株如 ZS19 接在经多菌灵药液处理过的芒果果实上后,可导致腐烂病斑,但病斑不扩展(图 2-B),而把这些菌株接种到只经清水处理的果实上后,导致 100% 的发病率和 62.5 病情指数,病斑呈急性型(图 2-C)。相反,对于高抗菌株如 ZR64,接种在经过多菌灵药液处理过的果实上

后,病斑表现、发病率和病情指数与接种到只经清水处理的果实上相近(图 2-E、F)。其中 A、D 为总对照,清水处理,接琼脂块,其刺伤部位变黑,但病斑不扩展。这些结果说明,在含药培养基上测定的芒果炭疽病菌对多菌灵的抗性与果实上的抗性有良好的对应关系,可作为抗药性大田监测的手段。

3 讨论

对不同来源的芒果炭疽病菌进行敏感性测定,证实了芒果炭疽病菌在我国热区芒果上已形成了对苯并咪唑类杀菌剂的高水平抗药性。并且证实了病菌抗药性的形成与喷药次数相关。芒果炭疽病菌属半知菌,在自然条件下以无性繁殖为主,此种生殖方式更有利于抗性菌株的抗药性得以稳定遗传。在室内,抗性菌株经继代培养 10 代后其抗性几乎不变,进一步证明了抗性遗传的稳定性。另外,高抗菌株在多菌灵 $1000\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PDA 培养基上仍可正常生长,而田间实际使用浓度为 $500 \sim 1000\mu\text{g}/\text{mL}$,若频繁使用多菌灵,在此药剂的选择压力下,敏感菌株将受到抑制,而抗性菌株不断扩展。由于抗药性菌株对苯并咪唑类杀菌剂有正交互抗性,而对病菌有不同作用机制的乙霉威和施宝克却表现正常的敏感性。因此,为了使病害得到有效控制,生产上有必要采用不同作用机制的杀菌剂轮换使用。

抗性菌株的菌落生长速度、菌落形态、分生孢

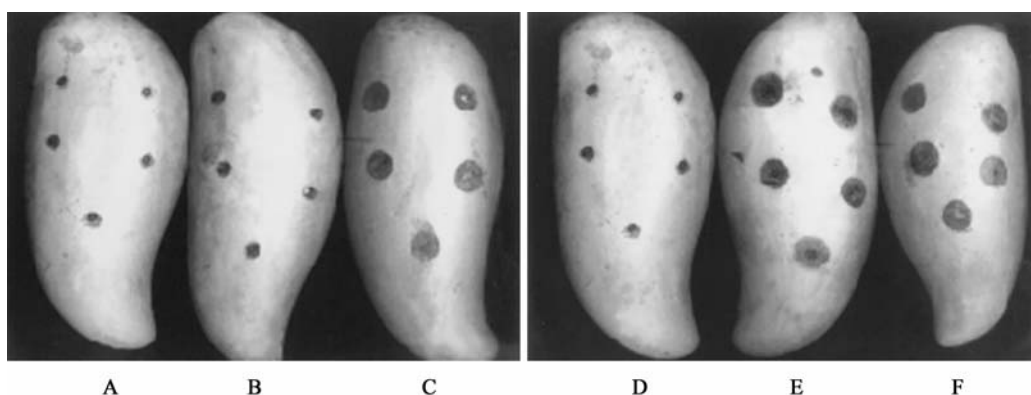


图2 参试菌株在离体芒果果实上对多菌灵的敏感性

Fig. 2 Sensitivity to carbendazim of tested isolates on mango fruits *in vitro*

注: A,D:果实浸泡清水后接琼脂培养基; B:果实浸泡多菌灵药液后接种 ZS19 菌株 (MIC = 0.110 μ g/mL); C:果实浸泡清水后接种 ZS19 菌株; E:果实浸泡多菌灵药液后接种 ZR64 菌株 (MIC > 500 μ g/mL); F:果实浸泡清水后接种 ZR64 菌株。Note: A,D: Inoculated with agar block on fruits soaked in hot water; B: Inoculated with sensitive isolate of ZS19 (MIC = 0.110 μ g/mL) on fruits soaked in hot carbendazim solution; C: Inoculated with isolate of ZS19 on fruits soaked in hot water; E: Inoculated with resistant isolate of ZR64 (MIC > 500 μ g/mL) on fruits soaked in hot carbendazim solution; F: Inoculated with isolate of ZR64 on fruits soaked in water.

子形态等生物学特性没有特异性,病菌的产孢能力和致病力与 MIC 也无关,表明病菌对多菌灵的抗性突变并不影响其正常的生理功能。另外,在培养基上测定的芒果炭疽病菌对多菌灵的抗性与在果实上的抗性有良好的对应关系,因此,在含药培养基上对病菌的测定可以作为抗药性大田监测的手段。

本研究筛选到了对多菌灵高水平抗性 (> 5000 倍)的菌株,为抗药性的治理、机制及利用研究提供了宝贵的材料。当然,由于收集菌株的地域有限,研究结果未能反映我国芒果炭疽病菌对多菌灵抗药性的全貌,还有待进一步研究。

参考文献 (References)

- 1 赵善欢. 植物化学保护. 北京: 中国农业出版社, 2002, 118 - 154
- 2 周明国, 叶钟音. 植物病原菌对苯并咪唑类及相关杀菌剂的抗性. 植物保护, 1987, (2): 31 - 33
- 3 Borck M K. Studies on the mode of action of benomyl in *Neurospora crassa*. Ph D Thesis, Louisiana State University, 1973, 171
- 4 Wilson L, Bryan J. Biochemical and pharmacological properties of microtubules. Advances in Cell and Molecular Biology, 1974, 4: 21 - 72
- 5 Rose V L. Herodima formation and tubulin function in *Saccharomy-*

- ces cerevisiae*. Ph D Thesis, Massachusetts Institute of Technology, 1999
- 6 肖倩纯, 余卓桐, 陈绵香, 等. 芒果炭疽病化学防治研究. 热带作物学报, 1999, (3): 25 - 30
- 7 Dodd J C, Bugante R, Koomen I, *et al.* Pre- and post-harvest control of mango anthracnose in the Philippines. Plant Pathology, 1991, 40: 576 - 583
- 8 Koenraadt H, Sonerville S C, Jones A L. Characterization of mutations in the beta-tubulin gene of benomyl-resistant fields strains of *Venturia inaequalis* and other plant pathogenic fungi. Phytopathology, 1992, 82(11): 1348 - 1354
- 9 Burland T G, Schedl T, Gull K, *et al.* Genetic analysis of resistance to benzimidazoles in *Physarum*: differential expression of β -tubulin genes. Genetics, 1984, 108: 123 - 141
- 10 Neff N F, Thomas J J, Grisafi P, *et al.* Isolation of the β -tubulin gene from yeast and demonstration of its essential function *in vivo*. Cell, 1983, 33: 211 - 219
- 11 Thomas J H, Neff N F, Botstein D. Isolation and characterization of mutation in the β -tubulin gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 1985, 112: 715 - 734
- 12 de Lapeyre de Bellaire L, Dubois C. Distribution of thiabendazole-resistant *Colletotrichum musae* isolates from Guadeloupe banana plantations. Plant Disease, 1997, 81: 1378 - 1383
- 13 Spalding D H. Resistance of mango pathogens to fungicides used to control postharvest diseases. Plant Disease, 1982, 66: 1185

Studies on carbendazim-resistance of *Colletotrichum gloeosporioides* on mango fruit

ZHAN Ru-lin¹ LI Wei² ZHENG Fu-cong²

(1. Southern Subtropical Crops Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Zhanjiang 524091, China; 2. Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou 571737, China)

Abstract: The samples of *Colletotrichum gloeosporioides* of mango in different orchards were collected and their resistance to carbendazim was tested *in vitro*. The results showed that the minimal inhibitory concentration (MIC) of sensitive isolates were 0.110 µg/mL. However, resistant isolates were able to grow well even on 500 µg/mL carbendazim. The resistance to carbendazim was stably inherited after continuously transferred for 10 generations on carbendazim-free PDA medium. Biological characters of resistant and sensitive isolates were tested and compared. The correlation analysis of MIC to no. of conidia produced and pathogenicity were carried out and the results showed that these factors were appeared no correlation of resistance to carbendazim. Resistant isolates showed positive cross-resistance to thiophanate-methyl, benomyl, thiabendazole and sensitivity to diethofencarb and prochloraz. The resistant and sensitive isolates were inoculated on mango fruits which were soaked in carbendazim solution *in vitro*. As a result, the fruits treated with fungicide and then inoculated with resistant isolates still showed disease symptoms as severe as the control, while the fruits inoculated with sensitive ones show no symptoms, which was response to resistant level of the isolates were tested on the PDA medium containing carbendazim. The tests on PDA medium can be used for supervising resistant isolates in the field.

Key words: *Colletotrichum gloeosporioides*; carbendazim; resistance to fungicide