

芒果炭疽病菌对多菌灵的抗药性监测

徐大高, 潘汝谦, 郑仲, 王振中

(华南农业大学 资源环境学院, 广东 广州 510642)

摘要:以 117 个野生型菌株菌丝生长的毒力测定结果建立了芒果炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides* 对多菌灵的敏感性基线,其平均 EC_{50} 为 $(0.056\ 8 \pm 0.001\ 8)\ \mu\text{g/mL}$,最低抑制浓度为 $1.0\ \mu\text{g/mL}$. 1996~2000 年监测了芒果炭疽病菌对多菌灵抗药性的发生情况,结果表明,芒果炭疽病菌群体中存在着对多菌灵抗性的群体,抗药菌株的频率为 48.59%,其中高抗与中抗菌株比例分别为 18.66% 和 18.00%,低抗与极高抗菌株比例分别为 7.38% 和 4.56%,讨论了不同地区菌株抗性频率存在差异的可能原因.

关键词:芒果; 胶胞炭疽菌; 多菌灵; 敏感性基线; 抗药性监测

中图分类号:S481.4

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2004)02-0034-03

Monitoring of the resistance of *Colletotrichum gloeosporioides* on mango anthracnose to the fungicide carbendazim

XU Da-gao, PAN Ru-qian, ZHENG Zhong, WANG Zhen-zhong

(College of Resources and Environment, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: The sensitivity base-line of *Colletotrichum gloeosporioides*, the causal agent of mango anthracnose, to the fungicide carbendazim was studied. The mean EC_{50} and minimum inhibitory concentration(MIC) values of carbendazim inhibiting mycelium growth of 117 wild-type isolates were $(0.056\ 8 \pm 0.001\ 8)\ \mu\text{g/mL}$ and $1.0\ \mu\text{g/mL}$, respectively. The resistance of *C. gloeosporioides* to carbendazim was monitored from 1996 to 2000, and the results showed that the resistance developed in the population. 48.59% of the tested isolates were resistant to carbendaim, and the percentage of the resistant isolates in high-level, mid-level, low-level and very-high-level were 18.66%, 18.0%, 7.38% and 4.56%, respectively. The dynamics of resistance to carbendazim was also discussed in the paper.

Key words: mango; *Colletotrichum gloeosporioides*; carbendazim; sensitivity base-line; resistance monitoring

由胶胞炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides* 引起的芒果炭疽病是芒果上发生最普遍、危害最严重的一种病害,同时也是芒果贮运期间最主要的病害,已经成为芒果发展的限制性因素之一^[1]. 该病原菌寄主范围极广,可侵染绝大多数热带亚热带果树^[2],同时由于病原菌具有被抑侵染的特性,通常在田间就有很高的侵染率,在果实进入贮运期后大量发病,导致大量损失腐烂. 加强田间防治和采后药剂处理是控制这一病害的关键措施,然而长期、单一及频繁用药使得常规药剂——苯并咪唑类杀菌剂在正常使用浓度下的防效逐步下降^[3],有关报道表明^[4]胶胞

炭疽病菌已对苯并咪唑类药剂产生了抗药性,但芒果炭疽病菌对苯并咪唑类药剂的抗药性在我国至今鲜有报道. 我们从 1996 年开始研究芒果炭疽病菌对多菌灵的抗药性,本文报道了部分研究结果.

1 材料与方法

1.1 试验菌株

从田间随机采集病叶、病果,叶片样本采用常规方法^[5]进行分离后再进行单孢分离纯化;病果经表面消毒、用灭菌水多次冲洗后进行保湿培养,从产生的粘孢团直接进行单孢分离. 共获得单孢菌株 461

株,其中 117 株为采自没有用药历史植株的野生型菌株.

供测定各菌株均在 PSA 培养基斜面上培养 7 d 后于 4 ℃ 冰箱中保存. 测定前接种在 PSA 培养基平板上预培养.

1.2 试验药剂及含药培养基制备

w 为 98.5% 的多菌灵 (carbendazim, MBC) 原药 (江苏新沂农药有限公司提供) 先溶解于 0.1 mol/L 稀盐酸中, 配成 $1 \times 10^4 \mu\text{g/mL}$ 的贮液备用. 使用时, 在定量的 PSA 培养基中加入一定量的多菌灵贮液, 配成一定浓度的含药培养基平板, 用于敏感性测定或抗药性监测.

1.3 敏感性测定

采用生长速率法之含毒介质培养法^[6]. 各试验菌株在 PSA 平板上恒温培养 7 d, 在菌落边缘制取 $d = 5 \text{ mm}$ 的菌丝块, 移至多菌灵质量浓度为 0、0.01、0.02、0.05、0.10、0.20、0.50、1.00 $\mu\text{g/mL}$ 系列平板上, 每处理重复 3 次, 培养 72 h 后测量菌落直径. 记载完全抑制菌落生长的药剂浓度 (即最低抑制浓度, MIC), 并以浓度对数 (X) 与抑制菌落生长百分率的机率值 (Y) 求取多菌灵对 *C. gloeosporioides* 的毒力回归方程 $Y = a + bX$, 并计算抑制菌体生长的有效中浓度 EC_{50} 值.

1.4 抗药性监测

在含 0、1、5、20、100、1 000 $\mu\text{g/mL}$ 多菌灵的平板, 放上打好的菌碟在恒温条件下培养, 以在含药 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 的平板上能生长的为抗药菌株, 不能生长的为敏感菌株. 统计抗性与敏感的菌株数目, 记载供测菌株在各浓度含药平板上的生长情况, 确定其抗性水平.

以上试验均在 25 ℃ 下进行.

2 结果与分析

2.1 芒果炭疽病菌对多菌灵的敏感性基线

用菌落直径法测得的 117 个野生型单孢菌株对多菌灵的敏感性呈连续型分布, 测得的 EC_{50} 值最小为 0.011 3 $\mu\text{g/mL}$ ($Y = 7.392 4 + 1.228 7 X$, $r = 0.997 0$), EC_{50} 最大为 0.098 2 $\mu\text{g/mL}$ ($Y = 6.315 5 + 1.305 2 X$, $r = 0.999 0$), 相差 8.69 倍, 表明芒果炭疽病菌群体对多菌灵的敏感性有一定的变异性; EC_{50} 的中间值为 0.058 2 $\mu\text{g/mL}$, 与其平均值 ($0.056 8 \pm 0.001 8$) $\mu\text{g/mL}$ 非常接近. 将 EC_{50} 值范围平均分成 10 个区间作频率分布图, 可以看出测定的 117 个野生型单孢菌株对多菌灵的敏感性频率分布呈正态分布 ($P = 0.520 1$) (图 1), 因此可将此平均值作为芒

果炭疽病菌对多菌灵的敏感性基线. 多菌灵对大部分野生菌株的最低抑制浓度 (MIC) 值小于 0.5 $\mu\text{g/mL}$, 少数菌株的 MIC 值高于 0.5 $\mu\text{g/mL}$, 但低于 1.0 $\mu\text{g/mL}$, 用 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 作为抗药性监测的标准可以准确地区分敏感菌株与抗药菌株.

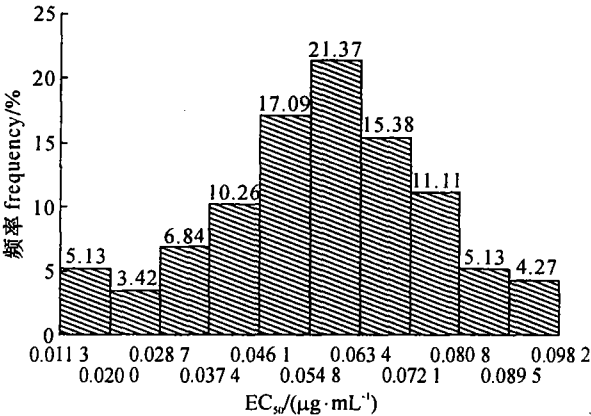


图 1 芒果炭疽病菌野生菌株对多菌灵敏感性分布
Fig. 1 Sensitivity distribution of wild-type isolates of *C. gloeosporioides* to carbendazim

2.2 芒果炭疽病菌对多菌灵的抗药性监测

根据敏感性基线研究的结果, 以 MIC = 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 为敏感基线监测了广东省芒果炭疽病菌对多菌灵的抗药性. 结果 (表 1) 表明, 1996 ~ 2000 年的

表 1 芒果炭疽病菌对多菌灵抗性的动态分布

Tab. 1 Dynamics of carbendazim resistance in the population of *C. gloeosporioides*

年份 year	采样地点 location	抗性株数 isolates resistant	测定株数 isolates tested	频率 frequency /%	年度频率 year frequency/%
1996	广州 Guangzhou	3	18	16.67	55.56
	深圳 Shenzhen	13	17	76.47	
	南海 Nanhai	8	14	57.14	
	中山 Zhongshan	16	23	69.57	
1997	广州 Guangzhou	4	31	12.90	58.41
	深圳 Shenzhen	21	27	77.78	
	南海 Nanhai	32	42	76.19	
	中山 Zhongshan	9	13	69.23	
1998	广州 Guangzhou	1	22	4.54	49.38
	深圳 Shenzhen	15	22	68.18	
	南海 Nanhai	14	21	66.67	
	中山 Zhongshan	10	16	62.50	
1999	广州 Guangzhou	3	40	7.50	43.24
	深圳 Shenzhen	16	24	66.67	
	南海 Nanhai	18	27	66.67	
	中山 Zhongshan	11	20	55.00	
2000	广州 Guangzhou	1	21	4.76	35.71
	深圳 Shenzhen	12	25	48.00	
	南海 Nanhai	9	20	45.00	
	中山 Zhongshan	8	18	44.44	

抗药菌株年度频率分别为 55.56%、58.41%、49.38%、43.24%、35.71%，芒果炭疽病菌对多菌灵抗性 ($MIC > 1 \mu g/mL$) 的菌株占群体的比例为 48.59% (图 2)，这表明芒果炭疽病菌群体中已存在抗多菌灵的亚群体。研究结果还表明，采自不同地区菌株的抗性频率在 4.54% ~ 77.78% 之间，不同地区间有明显的差异。广州地区采集的菌株多来自零星种植或作为绿化的芒果树，抗药菌株的频率较低 (4.54% ~ 16.67%)，而在深圳、南海及中山等地采集的菌株主要来自商品果场，抗药菌株的频率高达 44.44% ~ 77.78%。

2.3 芒果炭疽病菌对多菌灵的抗性水平分布

抗药性监测的结果 (图 2) 表明，在测定的 461 个芒果炭疽病菌菌株中，对多菌灵表现抗性 ($MIC > 1 \mu g/mL$) 的菌株占群体的比例为 48.59%，菌株抗药性水平以中抗 ($20 \mu g/mL < MIC < 100 \mu g/mL$) 与高抗 ($100 \mu g/mL < MIC < 1000 \mu g/mL$) 菌株为主，各有 83 和 86 个，分别占全部菌株数量的 18.00% 和 18.66%，低抗 ($1 \mu g/mL < MIC < 20 \mu g/mL$) 与极高抗 ($MIC > 1000 \mu g/mL$) 菌株各有 34 和 21 个，分别占 7.38% 和 4.56%。表明芒果炭疽病菌对多菌灵的抗药性已发展到一定的水平。

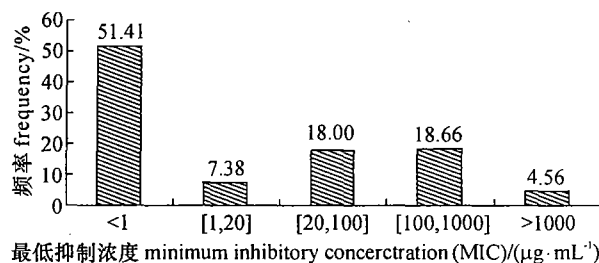


图 2 芒果炭疽病菌对多菌灵抗性水平分布

Fig. 2 Distribution of carbendazim resistance of *C. gloeosporioides*

3 讨论与结论

关于植物病原菌对杀菌剂抗药性的监测，最好是用 EC_{50} 值与敏感菌株的 EC_{50} 比较，以确定该菌株是否具有抗性，但在田间进行监测时，这样做工作量太大，对大规模监测显然是不利的。本研究的结果表明，多菌灵对芒果炭疽病菌野生型菌株的最低抑制浓度 MIC 值在 $0.5 \sim 1.0 \mu g/mL$ 间，因此以 $MIC = 1.0 \mu g/mL$ 为抗药性监测的标准，可以区分敏感菌株与抗性菌株。

芒果炭疽病是一种典型的多循环病害，在广东省尤其是珠江三角洲地区，芒果生长季节高温多雨，病害极易发生且危害严重。在长期、连续使用多菌灵等苯并咪唑类药剂进行防治后，防治效果下降的现象十分明显。本研究结果表明，在芒果炭疽病菌群体中，已存在对多菌灵具抗性的群体。这可能是这些地区使用多菌灵防治效果下降的主要原因。

周明国等^[7]认为，植物病原真菌一旦对苯并咪唑类药剂产生抗药性，通常即为高度抗性，很少有中度抗性和低抗菌株。本研究的结果表明，芒果炭疽病菌对多菌灵抗性的群体中以高度抗性和中度抗性为主，也基本反映了这一规律。

研究结果还表明，广东省芒果炭疽病菌对多菌灵的抗性在地区及抗性水平的分布上都有明显差异，估计与菌株来源、各地用药水平及防治历史有关。广州的菌株主要采自零星种植及绿化行道树，基本上没有用药防治的历史，因而抗药菌株频率很低；而深圳、东莞、中山等地的菌株都是采自商品果场，这些地区的化学防治水平较高，常年用药均在 5 ~ 7 次以上，导致炭疽病菌对多菌灵逐步表现出较强的耐药性，这可能是导致这些地区抗药菌株频率较高的根本原因。

参考文献：

- [1] 戚佩坤. 果蔬贮运病害[M]. 北京: 中国农业出版社, 1994. 91-93.
- [2] 戚佩坤. 广东果树真菌病害志[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000. 6-16.
- [3] SPALDING D H. Resistance of mango pathogens to fungicides used to control post-harvest diseases[J]. Plant Disease, 1982, 66(12): 1185-1186.
- [4] FARUNGSANG U, FARUNGSANG N. Benomyl resistance of *Colletotrichum* spp. associated with rambutan and mango fruit rot in Thailand[J]. Acta Horticulturae, 1992, 321: 891-897.
- [5] 方中达. 植病研究方法[M]. 第3版. 北京: 中国农业出版社, 1998. 122-126.
- [6] 黄彰欣. 植物化学保护实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 1993. 56-59.
- [7] 周明国, 叶钟音, 刘经芬. 南京市郊灰霉病菌对苯并咪唑类杀菌剂田间抗性的检测[J]. 南京农业大学学报, 1987, 6(2): 53-57.

【责任编辑 周志红】