

苹果树腐烂病菌对苯醚甲环唑的敏感性

刘娟, 冯浩, 王帅, 高小宁, 黄丽丽*

(西北农林科技大学植物保护学院, 杨凌 712100)

摘要 为了明确苹果树腐烂病菌对苯醚甲环唑的敏感性现状,本研究采用菌丝生长速率法测定了来自7个省份7个不同年份的106株苹果树腐烂病菌对苯醚甲环唑的敏感性,并建立了敏感基线。结果表明:供试苹果树腐烂病菌菌株的 EC_{50} 区间在 $0.003\sim 0.123\ \mu\text{g}/\text{mL}$,敏感性频率分布呈连续性单峰曲线。经K-S法检验符合正态分布,未出现敏感性明显下降的抗性群体,平均 EC_{50} (0.044 ± 0.029) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 可作为苹果树腐烂病菌对苯醚甲环唑的敏感基线。不同地理来源的菌株对苯醚甲环唑的敏感性有显著性差异,来自辽宁省的菌株敏感性最高,河南省的敏感性最低;不同年份的菌株敏感性也有显著性差异,2009年采集的菌株对苯醚甲环唑的敏感性最高,2016年采集的菌株敏感性最低,菌株对药剂的敏感性随年份的推移逐渐降低,说明病菌的抗药性不断增强。

关键词 苹果黑腐皮壳菌; 菌落直径; 苯醚甲环唑; EC_{50} ; 抗药性

中图分类号: S 436.611.11 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2018119

Sensitivity of *Valsa mali* to difenoconazole in China

LIU Juan, FENG Hao, WANG Shuai, GAO Xiaoning, HUANG Lili

(College of Plant Protection, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

Abstract To confirm the sensitivity of *Valsa mali* to difenoconazole, the sensitivity baseline was established by measuring the mycelial growth of 106 isolates collected from seven provinces in seven different years on the fungicide-amended media. The results indicated that 50% effective concentration (EC_{50}) values ranged from $0.003\ \mu\text{g}/\text{mL}$ to $0.123\ \mu\text{g}/\text{mL}$. Sensitivity frequency distribution showed a continuous single peak curve, which is a normal distribution based on analyzed results by K-S method. No resistant strain to difenoconazole was found in the tested isolates, and the average EC_{50} value ($0.044\ \mu\text{g}/\text{mL}\pm 0.029\ \mu\text{g}/\text{mL}$) could be the sensitivity baseline of *V. mali* to difenoconazole. The isolates collected from different regions showed different sensitivities. The sensitivity of *V. mali* from Liaoning Province was the highest, while that from Henan Province was the lowest. Meanwhile, the sensitivity of *V. mali* collected in different years also showed significant difference to difenoconazole. The sensitivity of *V. mali* collected in 2009 was the highest, while that collected in 2016 was the lowest. The sensitivity of strains decreased along with years, indicating the resistance of *V. mali* to difenoconazole was increasing.

Key words *Valsa mali*; colony diameter; difenoconazole; EC_{50} ; fungicide resistance

苹果树腐烂病(apple *Valsa* canker)是由苹果黑腐皮壳属真菌 *Valsa mali* 侵染引起的枝干病害^[1]。该病的发生会造成树皮组织腐烂,树势削弱,甚至枝枯树死,果树寿命缩短^[2]。因其侵染途径多样、潜伏性强、致病机理复杂,病害防控困难,治愈率低,被称为“苹果的癌症”^[3]。

目前,生产上苹果树腐烂病主要依靠刮除病疤后涂抹药剂或全树喷淋药剂等措施进行防治,所用药剂种类繁多^[4-5]。化学药剂因其操作简单,使用方便且见效快而成为防治苹果树腐烂病的主要药剂。

其中甲基硫菌灵可以高效预防腐烂病菌的侵染^[6],丁香菌酯能有效抑制苹果树腐烂病病疤的复发^[7],戊唑醇能有效抑制苹果树腐烂病菌孢子萌发和菌丝生长^[8]。而三唑类杀菌剂苯醚甲环唑虽然尚未在苹果树腐烂病上登记使用,但是其对腐烂病菌室内效果要强于同类杀菌剂戊唑醇^[8],可以作为防治苹果树腐烂病的替代药剂。

苯醚甲环唑由先正达公司于1989年研发上市,具有高效、广谱、低毒的特点,对子囊菌门和担子菌门的病菌有很好的防治效果^[9]。其作用机制是抑制

真菌细胞膜上的麦角甾醇合成,破坏细胞膜结构,造成功能紊乱,从而达到杀菌的目的^[10-11]。由于该药剂作用位点单一,长期反复使用会引起病菌产生抗药性^[12],被认为是一种具有中等抗性风险的杀菌剂。苹果黑星病菌 *Venturia inaequalis*、小麦赤霉病菌 *Fusarium graminearum* 对该药剂已经产生了抗性^[13-14]。近年来,我国各地苹果产业区普遍应用苯醚甲环唑等三唑类杀菌剂防治各类真菌病害,是否有抗药性菌株尚不明确。因此,本研究通过测定采自全国的 106 株苹果树腐烂病菌对苯醚甲环唑的敏感性,并比较不同地理来源、不同年份的菌株敏感性差异,以期明确苹果树腐烂病菌对该药剂的敏感性现状,为病害的科学防治和病菌的抗药性监测提供重要科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株

本实验室自 2007 至 2016 年从陕西、山西和河南等省苹果产区的田间发病植株采集分离了 106 株苹果树腐烂病菌,其中陕西省 54 株,山西省 18 株,新疆维吾尔自治区 10 株,河南省 11 株,辽宁省 5 株,山东省 4 株,四川省 4 株,用于敏感性测定。

1.1.2 供试药剂与浓度

95.6%苯醚甲环唑原药,先正达公司提供;浓度设置为 0.006 3、0.013、0.025、0.050、0.100 和 0.200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.2 方法

1.2.1 含药培养基的制备

将苯醚甲环唑原药溶于丙酮制成 10 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 母液,加入终浓度为 0.2% 的 Tween-80,置于 4℃ 冰箱中备用。用蒸馏水稀释母液,按设置浓度加入到 PDA 培养基中,充分混匀,配成不同质量浓度的苯醚甲环唑含药平板。

1.2.2 敏感性测定

参考 Yin 等^[15]的方法进行。被测菌株于 25℃ 条件下在 PDA 平板上培养 72 h,利用打孔器自菌落边缘打取大小相同、直径为 5 mm 的菌饼,菌丝面朝下接种于含药平板的中心。每个浓度重复 3 次,以不加药的 PDA 平板作为对照。25℃ 下培养 72 h,用十字交叉法测量菌落直径,取平均值,计算不同浓度的苯醚甲环唑对菌丝的生长抑制率。

菌丝生长抑制率 = [(对照菌落直径 - 处理菌落直径) / (对照菌落直径 - 菌饼直径)] × 100%。

以 X(药剂质量浓度的对数值)和 Y(抑制率对

应的几率值)进行回归分析得到毒力回归方程 $Y = a + bX$ 以及相关系数 r ,并计算 EC_{50} 。

1.2.3 数据处理

试验数据采用 Microsoft Excel 2010 和 SPSS 16.0 进行处理。对 EC_{50} 进行 Kolmogorov-Smirnov 正态性检验,参照祁之秋等的方法^[16]获得苹果树腐烂病菌群体对苯醚甲环唑的敏感性频率分布图,建立对苯醚甲环唑的敏感基线。采用 Duncan 氏新复极差法对不同地区、不同年份的平均 EC_{50} 进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 苹果树腐烂病菌对苯醚甲环唑的敏感基线的建立

检测发现,苯醚甲环唑对来自 7 个省的 106 株苹果树腐烂病菌的 EC_{50} 分布在 0.003~0.123 $\mu\text{g}/\text{mL}$,平均值为 (0.044 ± 0.029) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。所检测的菌株对该药剂具有较高的敏感性,未发现抗药性亚群体。但最大值为最小值的 41 倍, EC_{50} 跨度范围比较大,表明群体内个体间对苯醚甲环唑的敏感性差异较大。

将本研究得到的 EC_{50} 分成 6 个区间,每个区间出现的菌株频率如图 1 所示, EC_{50} 敏感性频率呈现连续性单峰曲线分布,通过 SPSS 中的 K-S 正态检验得到 $P = 0.135 > 0.05$,说明菌株对苯醚甲环唑的敏感性频率符合正态分布,按照野生病原群体对药剂的敏感性呈正态分布的原理,本研究中 106 株病菌的平均 EC_{50} (0.044 $\mu\text{g}/\text{mL} \pm 0.029 \mu\text{g}/\text{mL}$) 可作为苹果树腐烂病菌对苯醚甲环唑的敏感基线。

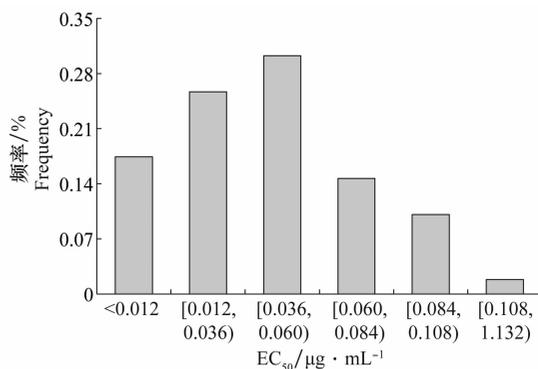


图 1 106 株苹果树腐烂病菌对苯醚甲环唑的敏感性频率分布图

Fig. 1 Sensitivity frequency distribution of the 106 *Valsa mali* strains to difenoconazole

2.2 不同地理来源的菌株对苯醚甲环唑的敏感性水平

不同地理来源的苹果树腐烂病菌菌株对苯醚甲环唑的敏感性存在一定的差异(表 1),最敏感的是辽宁菌株,其 EC_{50} 平均值为 (0.020 0 ± 0.008 8) $\mu\text{g}/\text{mL}$,

最不敏感的是河南菌株,其 EC₅₀ 平均值为(0.059 6 ± 0.023 6) μg/mL。山西、新疆、河南的菌株群体内部个体对苯醚甲环唑的敏感性差异较大。辽宁地区的

菌株同河南、山东和新疆 3 个地区的菌株在 P = 0.05 水平上差异显著,其他地区的菌株对苯醚甲环唑的敏感性无显著差异。

表 1 苯醚甲环唑对不同地理来源的苹果树腐烂病菌的 EC₅₀¹⁾

Table 1 EC₅₀ values of difenoconazole to *Valsa mali* collected from different regions

地区 Region	株数/株 Isolate number	EC ₅₀ 分布范围/μg · mL ⁻¹ Range of EC ₅₀ value	平均 EC ₅₀ /μg · mL ⁻¹ Average of EC ₅₀ value
河南 Henan	11	0.003~0.123	(0.059 6 ± 0.023 6)a
山东 Shandong	4	0.030~0.086	(0.057 8 ± 0.022 5)a
新疆 Xinjiang	10	0.004~0.103	(0.055 5 ± 0.022 1)a
陕西 Shaanxi	54	0.006~0.100	(0.041 0 ± 0.020 2)ab
山西 Shanxi	18	0.006~0.116	(0.039 6 ± 0.013 8)ab
四川 Sichuan	4	0.022~0.045	(0.032 5 ± 0.013 2)ab
辽宁 Liaoning	5	0.004~0.030	(0.020 0 ± 0.008 8)b

1) 按照 SPSS 16.0 软件中的 Duncan 氏新复极差分析法,同列数据后不同小写字母者表示在 0.05 水平上差异显著。下同。

Different letters in same column indicated significant difference (P < 0.05) based on Duncan's multiple range test. The same below.

2.3 不同年份的苹果树腐烂病菌对苯醚甲环唑的敏感性水平

如表 2 所示,采自不同年份的苹果树腐烂病菌对苯醚甲环唑的敏感性存在一定差异。2009 年采

集的菌株对苯醚甲环唑的敏感性最高,2016 年菌株的敏感性最低,随着年份推移病菌对苯醚甲环唑的敏感性逐渐减弱。

表 2 苯醚甲环唑对不同年份的苹果树腐烂病菌的 EC₅₀

Table 2 EC₅₀ values of difenoconazole to *Valsa mali* collected in different years

年份 Year	菌株数/株 Isolate number	频率/% Frequency	EC ₅₀ 分布范围/μg · mL ⁻¹ Range of EC ₅₀ value	平均 EC ₅₀ /μg · mL ⁻¹ Average of EC ₅₀ value
2016	8	7.5	0.004~0.103	(0.061 1 ± 0.031 5)a
2014	11	10.4	0.003~0.123	(0.059 6 ± 0.027 2)a
2012	12	11.3	0.009~0.099	(0.051 8 ± 0.025 7)ab
2010	11	10.4	0.007~0.100	(0.044 9 ± 0.022 8)ab
2007	18	17.0	0.006~0.116	(0.044 4 ± 0.022 1)ab
2011	12	11.3	0.007~0.088	(0.042 8 ± 0.021 3)ab
2009	34	32.1	0.006~0.087	(0.033 3 ± 0.015 2)b

3 讨论

杀菌剂用于防治某种植物病害之前,建立其敏感基线有助于优化该杀菌剂的使用策略^[17]。虽然苯醚甲环唑已经在生产上应用多年,但苹果树腐烂病菌对其敏感性水平尚不明确。本研究共检测了采自中国 7 个省份的 106 株苹果树腐烂病菌对苯醚甲环唑的敏感性。研究结果表明中国苹果树腐烂病菌对苯醚甲环唑还处于野生敏感种群阶段,可将苯醚甲环唑对供试菌株的 EC₅₀ 平均值(0.044 ± 0.029) μg/mL 作为中国苹果树腐烂病菌对苯醚甲环唑的敏感基线。该敏感基线可用于监测田间苹果树腐烂病菌群体对苯醚甲环唑敏感性的变化,为评价其抗药性风险和未来制定抗药性治理策略提供参考。

本研究发现苹果树腐烂病菌对苯醚甲环唑的敏感性差异与地理位置有关,这可能与不同地区的苹

果种植年限和面积、气候环境条件、腐烂病的发生历史,用药措施以及病菌本身的遗传差异及群体组成等因素有关^[18]。此外,随着时间的推移,苹果树腐烂病菌对苯醚甲环唑的敏感性逐渐减弱,可能是由于生产中连续大量使用同类杀菌剂或者其他有交互抗性的杀菌剂,使得病菌对杀菌剂的敏感性发生了改变。为了延缓苹果树腐烂病菌对苯醚甲环唑抗药性的产生,建议在田间通过轮换使用不同作用机制的药剂,使苹果树腐烂病菌对苯醚甲环唑的敏感性处于低抗性频率阶段,以延长农药的使用寿命。

参考文献

[1] WANG Xuli, ZANG Rui, YIN Zhiyuan, et al. Delimiting cryptic pathogen species causing apple Valsa canker with multilocus data [J]. Ecology and Evolution, 2014, 4(8): 1369 - 1380.
[2] 黄丽丽,张管曲,康振生,等. 果树病害图鉴[M]. 西安:西安地图出版社, 2001: 1.

- [3] 曹克强, 国立耘, 李保华, 等. 中国苹果树腐烂病发生和防治情况调查[J]. 植物保护, 2009, 35(2): 114 - 117.
- [4] 焦浩, 范艳云, 高小宁, 等. 8 种药剂对苹果树腐烂病的田间防效评价[J]. 河南农业科学, 2015, 44(10): 95 - 99.
- [5] 翟慧者, 胡同乐, 陈曲, 等. 10 种化学杀菌剂对苹果树腐烂病的防效评价[J]. 植物保护, 2012, 38(3): 151 - 154.
- [6] TAMURA O, SAITO I. Histopathological changes of apple bark infected by *Valsa ceratosperma* (Tode ex Fr.) Maire during dormant and growing periods [J]. Annals of the Phytopathological Society of Japan, 2009, 48: 490 - 498.
- [7] 陈亮, 刘君丽, 司乃国, 等. 丁香菌酯对苹果树腐烂病的防治[J]. 农药, 2009, 48(6): 402 - 404.
- [8] 王磊, 郜佐鹏, 黄丽丽, 等. 防治苹果树腐烂病杀菌剂的室内筛选[J]. 植物病理学报, 2009, 39(5): 549 - 554.
- [9] 刘长令. 世界农药大全[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 122 - 126, 155 - 158, 281 - 282.
- [10] 祁之秋, 周民国. 戊唑醇对小麦纹枯病菌的抑菌作用[J]. 农药学报, 2003, 5(3): 80 - 84.
- [11] 吴学宏, 肖建华, 张文华, 等. 2%三唑醇·戊唑醇种衣剂对小麦纹枯病菌变角甾醇含量的影响[J]. 农药学报, 2005, 7(4): 372 - 375.
- [12] 刘保友, 张伟, 栾炳辉, 等. 苹果轮纹病菌对苯醚甲环唑和氟硅唑的敏感性及其交互抗性[J]. 植物病理学报, 2013, 43(5): 541 - 548.
- [13] HENRÍQUEZ S J L, SAEMIENITO V O, ALACÓN C P. Sensitivity of *Venturia inaequalis* Chilean isolates to difenoconazole, fenarimol, mancozeb and pyrimethanil [J]. Chilean Journal of Agricultural Research, 2011, 71(1): 39 - 44.
- [14] RCKANOVIĆE, MIHAJLOVIĆM, POTOČNIK I. *In vitro* sensitivity of *Fusarium graminearum* (Schwabe) to difenoconazole, prothioconazole and thiophanate-methyl [J]. Pesticide Phytomedicine, 2010, 25(4): 325 - 333.
- [15] YIN Y, LIU X, LI B, et al. Characterization of sterol demethylation inhibitor-resistant isolates of *Fusarium asiaticum* and *F. graminearum* collected from wheat in China [J]. Phytopathology, 2009, 99(5): 487 - 497.
- [16] 祁之秋, 鞠雪娇, 纪明山, 等. 辽宁省稻瘟病菌对咪鲜胺敏感基因的建立[J]. 农药学报, 2012, 14(6): 673 - 676.
- [17] CHEN Yu, YAO Jian, WANG Wenxiang, et al. Effect of epoxiconazole on rice blast and rice grain yield in China [J]. European Journal of Plant Pathology, 2013, 135(4): 675 - 682.
- [18] 齐永志, 李海燕, 苏媛, 等. 小麦纹枯病菌对咪唑酰胺的敏感性及其抗性突变体的主要生物学性状[J]. 农药学报, 2014(3): 271 - 280.

(责任编辑: 杨明丽)

(上接 158 页)

- [3] HAN Dejun, WANG Qilin, CHEN Xianming, et al. The emerging Yr26-virulent races of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* are threatening the wheat production in the Sichuan basin, China [J]. Plant Disease, 2015, 99(6): 754 - 760.
- [4] WAN Anmin, ZHAO Zhonghua, CHEN Xianming, et al. Wheat stripe rust epidemics and virulence of *Puccinia striiformis* in China in 2002 [J]. Plant Disease, 2003, 88(8): 896 - 904.
- [5] 陈万权, 康振生, 马占鸿, 等. 中国小麦条锈病综合治理理论与实践[J]. 中国农业科学, 2013, 46(20): 4254 - 4262.
- [6] CHEN Wanquan, WU Liren, LIU Taiguo, et al. Race dynamics, diversity, and virulence evolution in *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, the causal agent of wheat stripe rust in China from 2003 to 2007 [J]. Plant Disease, 2009, 93: 1093 - 1101.
- [7] 刘博, 刘太国, 章振羽, 等. 中国小麦条锈菌条中 34 号的发现及其致病特性[J]. 植物病理学报, 2017, 47(5): 681 - 687.
- [8] LIU Taiguo, PENG Yunliang, CHEN Wanquan, et al. First detection of virulence in *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in China to resistance genes Yr24(=Yr26) present in wheat cultivar Chuanmai 42 [J]. Plant Disease, 2010 (94): 1163.
- [9] 刘太国, 王保通, 贾秋珍, 等. 2010—2011 年度我国小麦条锈菌生理分化研究[J]. 麦类作物学报, 2012, 32(3): 574 - 578.
- [10] 牛永春, 吴立人. 繁 6-绵阳系小麦抗条锈性变异及对策[J]. 植物病理学报, 1997, 17(1): 5 - 8.
- [11] 曹世勤, 张勃, 李明菊, 等. 甘肃省 50 个主要小麦品种(系)苗期抗条锈基因推导及成株期抗病性分析[J]. 作物学报, 2011, 37(8): 1360 - 1371.
- [12] 陈万权, 刘太国, 陈巨莲, 等. 小麦抗病虫性评价技术规范. 第 1 部分: 小麦抗条锈病评价技术规范: NY/T1443. 1 - 2007 [S]. 北京: 中国农业出版社, 2007.
- [13] 贾秋珍, 黄瑾, 曹世勤, 等. 感染我国重要小麦抗源材料贵农 22 的条锈菌新菌系的发现及致病性初步分析[J]. 甘肃农业科技, 2012(1): 3 - 5.
- [14] 徐志, 王胜, 姬红丽, 等. 四川小麦条锈病菌贵农 22 致病类群流行对小麦品种抗性的影响[J]. 西南农业学报, 2016, 29(6): 2845 - 2853.
- [15] 任勇, 李生荣, 周强, 等. 134 份四川小麦品种(系)的条锈病抗性评价[J]. 麦类作物学报, 2014, 50(6): 847 - 853.
- [16] 张培禹, 曾庆东, 王琪琳, 等. 四川盆地小麦品种(系)抗条锈性鉴定与评价[J]. 麦类作物学报, 2012, 50(4): 779 - 783.
- [17] 李北, 徐琪, 杨宇衡, 等. 重庆麦区小麦品种(系)抗条锈性评价与基因分析[J]. 中国农业科学, 2017, 50(3): 413 - 425.
- [18] REN Yong, LI Shengrong, WEI Yuming, et al. Molecular mapping of a stripe rust resistance gene in Chinese wheat cultivar Mianmai 41 [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2015, 14(2): 295 - 304.
- [19] LI Gaoqi, LI Zaifeng, YANG Wuyun, et al. Molecular mapping of stripe rust resistance gene YrCH42 in Chinese wheat cultivar Chuanmai 42 and its allelism with Yr24 and Yr26 [J]. Theoretical & Applied Genetics, 2006, 112: 1434 - 1440.
- [20] ZENG Shimai, LUO Yong. Long-distance spread and interregional epidemics of wheat stripe rust in China [J]. Plant Disease, 2006, 90(8): 979 - 988.
- [21] 贾秋珍, 曹世勤, 黄瑾, 等. 2013—2016 年甘肃省小麦条锈菌生理小种变异监测[J]. 植物保护, 2018, 44(6): 162 - 167.

(责任编辑: 杨明丽)