

吴娥娇, 郭文龙, 王志伟, 等. 不同地域草莓拟盘多毛孢根腐病菌致病力差异及对苯醚甲环唑的敏感性[J]. 江苏农业学报, 2023, 39(1): 44-52.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2023.01.006

不同地域草莓拟盘多毛孢根腐病菌致病力差异及对苯醚甲环唑的敏感性

吴娥娇¹, 郭文龙^{1,2}, 王志伟^{1,2}, 关玲¹, 乔玉山¹, 赵密珍¹

(1.江苏省农业科学院果树研究所/江苏省高效园艺作物遗传改良重点实验室, 江苏 南京 210014; 2.扬州大学园艺与植物保护学院, 江苏 扬州 225009)

摘要: 近年来中国草莓主产区拟盘多毛孢根腐病大面积发生并呈危害加重趋势。为明确不同地域来源拟盘多毛孢根腐病菌的致病力差异及其对苯醚甲环唑的敏感性, 采用离体叶片和菌丝生长速率法对收集到的不同地域的 73 株病原菌菌株进行致病力分析和苯醚甲环唑敏感性测定。结果表明, 不同地域来源的菌株致病力差异极显著, 且和采样地年平均温度呈显著正相关。不同病原菌菌株对苯醚甲环唑的敏感性呈单峰分布, EC_{50} 范围为 0.01~2.94 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 平均值为 1.34 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。菌丝生长速率与 AUDPC(病情发展曲线下面积)之间无相关性, 不同苯醚甲环唑质量浓度下菌丝生长速率和产孢量之间的相关性存在差异。研究结果为苯醚甲环唑应用于草莓拟盘多毛孢根腐病的精准防控提供科学依据。

关键词: 草莓拟盘多毛孢根腐病菌; 苯醚甲环唑; 致病力; 敏感性

中图分类号: S436.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2023)01-0044-09

Virulence difference and sensitivity analysis to difenoconazole of *Neopestalotiopsis clavispora* crown rot pathogens isolated from strawberry plants of different areas in China

WU E-jiao¹, GUO Wen-long^{1,2}, WANG Zhi-wei^{1,2}, GUAN Ling¹, QIAO Yu-shan¹, ZHAO Mi-zhen¹

(1. Institute of Pomology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Jiangsu Key Laboratory for Horticultural Crop Genetic Improvement, Nanjing 210014, China; 2. College of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: Strawberry crown rot caused by *Neopestalotiopsis* spp. has occurred in many areas in China and led to an increasing economic loss in recent years. In order to clarify the virulence difference of *Neopestalotiopsis* crown rot pathogens from different geographical sources and their sensitivity to difenoconazole, the pathogenicity analysis and sensitivity to difenoconazole of 73 pathogenic strains collected from different regions were determined by *in vitro* leaf and mycelial growth rate method. The results showed that the virulence of strains from different geographical sources was significantly different, and significantly positively correlated with the annual mean temperature of the sampling sites. The sensitivity of different

pathogenic strains to difenoconazole showed a single peak distribution. The EC_{50} values of the 73 *N. clavispora* isolates ranged from 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ to 2.94 $\mu\text{g}/\text{ml}$, with an average of 1.34 $\mu\text{g}/\text{ml}$. There was no correlation between mycelial growth rate and area under disease progress curve (AUDPC), and the correlation between mycelium growth rate and conidia production was different under different difenoconazole concentrations. The results provide a scien-

收稿日期: 2022-10-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(32102337); 国家重点研发计划项目(2019YFD1000800); 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(21)2019]

作者简介: 吴娥娇(1988-), 女, 河南商丘人, 博士, 助理研究员, 主要从事草莓病害流行与防控研究。(E-mail) 20190028@jaas.ac.cn

通讯作者: 赵密珍, (E-mail) njzhaomz@163.com

tific basis for the application of difenoconazole in the precise prevention and control of strawberry *Neopestalotiopsis* crown rot.

Key words: *Neopestalotiopsis clavispora* from strawberry crown root; difenoconazole; virulence; sensitivity

据联合国粮农组织统计,中国 2021 年草莓栽培总面积达 $1.29 \times 10^5 \text{ hm}^2$,总产量达 $3.39 \times 10^6 \text{ t}$,产值超过 2.50×10^{10} 元,是世界最大的草莓生产和消费国(<http://faostat.fao.org/>)。随着草莓生产的产业化和规模化发展,大面积栽培品种单一化、过度连作和高度设施化等,使草莓生产上呈现出次要病害猖獗、病原物致病型变异加快的特点^[1-2]。甜查理是中国栽培面积一度占居第二位的主栽品种^[3]。由拟盘多毛孢(*Neopestalotiopsis*)引起的草莓拟盘多毛孢根腐病(*Neopestalotiopsis* crown rot)在甜查理及其为亲本育成的品种上发生严重,且呈现逐年加重趋势,个别田块发病率高达 90% 以上,造成绝产、绝收,已成为当前制约草莓生产的一种毁灭性病害^[4]。

目前中国对草莓拟盘多毛孢根腐病的研究还处于起步阶段,多集中于致病菌的分离鉴定、防控药剂筛选等方面^[4-12]。对该病害的命名和主要致病菌的鉴定结果不一,多数学者认为草莓出现叶片发红枯死是由草莓根腐病菌引起。宁志怨等^[4]在 2019 年首次报道了引起安徽省草莓红叶病的主要致病菌是棒状拟盘多毛孢(*Pestalotiopsis clavispora*);刘艳茹等^[5]研究发现引起江苏省徐州市草莓红叶根腐病的致病菌为 *Neopestalotiopsis roase*;赵景楠等^[6]认为引起草莓棒状拟盘多毛孢叶斑病的主要致病菌也是棒状拟盘多毛孢;赵宇等^[7]认为拟盘多毛孢是引起草莓出现红叶枯死病的优势致病菌。目前生产上主要使用化学药剂进行草莓拟盘多毛孢根腐病的防控。苯醚甲环唑是一种内吸性广谱杀菌剂,通过抑制真菌细胞膜上甾醇类化合物的合成而影响细胞的正常生物代谢,对多种真菌病害具有较好的防治效果^[13],在草莓生产上大面积且长期使用。温浩等^[9]测定了 9 种杀菌剂对新拟盘多毛孢病菌(*Pestalotiopsis clavispora*)的室内毒力,发现苯醚甲环唑的平均 EC_{50} 为 $0.47 \mu\text{g/ml}$ 。宁志怨等^[10]测定草莓红叶病原菌(*Pestalotiopsis clavispora*)对 9 种常用杀菌剂的敏感性时发现苯醚甲环唑在苗期和大田生长期的防效分别达 90.16% 和 61.89%。刘艳茹^[11]的研究结果表明苯醚甲环唑对草莓拟盘多毛孢根腐病菌(*Neopestalotiopsis roase*)的最高抑制率达 93.60%,对盆栽苗的最佳防效为 96.67%,平均 EC_{50} 为 $0.06 \sim 0.84 \mu\text{g/ml}$ 。李忠峰等^[12]研究结果表明

10.00% 的苯醚甲环唑对草莓红斑叶枯病病原菌(*Pestalotiopsis clavispora*)的 EC_{50} 为 $11.88 \mu\text{g/ml}$,抑制率高达 94.91%。

目前,关于草莓拟盘多毛孢根腐病菌致病力的研究报道很少,尤其是针对不同地域来源草莓拟盘多毛孢根腐病菌致病力差异与其对苯醚甲环唑敏感性的关联分析基本空白。本研究对 2020 年 3–5 月从中国 25 个地区分离到的 288 株病原菌中挑选 73 株代表性草莓拟盘多毛孢根腐病菌进行致病力分析及其对苯醚甲环唑的敏感性测定,以期明确不同地域来源病原菌的致病力差异,并探究其对苯醚甲环唑的敏感性,为杀菌剂的高效应用和草莓拟盘多毛孢根腐病的精准防控提供科学依据和指导。

1 材料与方法

1.1 样本采集

于 2020 年 3–5 月在草莓拟盘多毛孢根腐病发生盛期从中国 15 个省、直辖市和自治区的 25 个草莓种植区(表 1)采集草莓植株定植后未使用过苯醚甲环唑及其相同作用机制杀菌剂且具有典型症状的设施栽培草莓发病植株(图 1),草莓品种主要有甜查理、宁玉和宁丰等。

1.2 供试菌株

采用组织分离法^[14]进行草莓拟盘多毛孢根腐病菌的分离,挑取单孢进行病原菌纯化(图 1),结合形态学和分子生物学进行病原菌鉴定,最终获得病原菌 288 株(表 1)。依据地域来源、寄主品种和病原菌鉴定结果选取 73 株草莓拟盘多毛孢根腐病菌菌株(表 2)用于后续研究。

1.3 供试药剂

96.00% 苯醚甲环唑(Difenoconazole),购于上海安谱实验科技股份有限公司,用丙酮配制成 $1.0 \times 10^5 \mu\text{g/ml}$ 母液,于 4 °C 冰箱保存,备用。99.50% 丙酮,购于国药集团化学试剂有限公司。

1.4 供试培养基

PDA 培养基:马铃薯(去皮)200 g,葡萄糖 20 g,琼脂粉 18 g,加入 1 000 ml 超纯水中,沸水煮 20 min 用四层纱布过滤后补充超纯水至 1 000 ml,121 °C 灭菌 20 min 后备用。

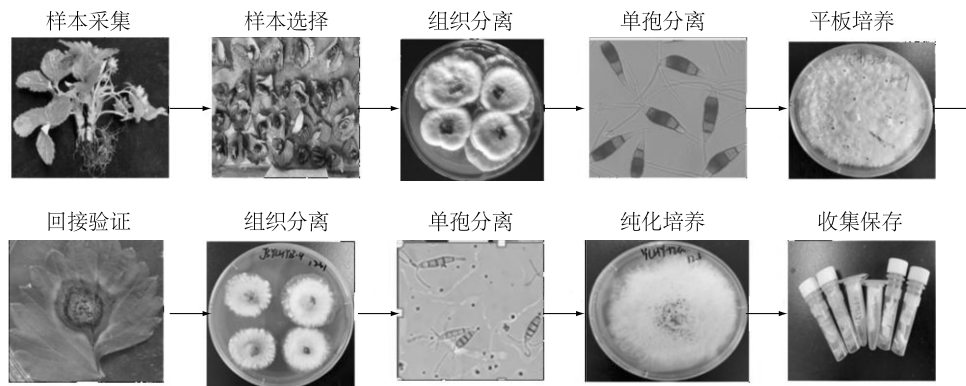


图1 草莓拟盘多毛孢根腐病菌的分离、纯化与保存流程

Fig.1 Isolation, purification and preservation of *Neopestalotiopsis clavispora* crown rot pathogen from strawberry plant

表1 草莓拟盘多毛孢根腐病菌菌株采集信息

Table 1 Information of *Neopestalotiopsis clavispora* collected from infected strawberry plant

| 采样地点 | 草莓品种 | 菌株数 |
|---------|----------|-----|
| 辽宁丹东 | 妙香7号 | 3 |
| 浙江杭州 | 红玉 | 2 |
| 江西南昌 | 甜查理 | 4 |
| 河北承德 | 圣诞红 | 3 |
| 北京顺义 | 甜查理、京藏香 | 2 |
| 云南昆明 | 甜查理 | 24 |
| 安徽合肥 | 甜查理 | 8 |
| 河南商丘 | 甜查理 | 3 |
| 内蒙古呼和浩特 | 甜查理 | 18 |
| 山东济南 | 蒙特瑞 | 3 |
| 山东临沂 | 甜查理 | 25 |
| 四川凉山 | 黔莓一号、甜查理 | 50 |
| 湖北襄阳 | 甜查理 | 2 |
| 湖北随州 | 甜查理 | 6 |
| 广东深圳 | 法兰蒂 | 6 |
| 广东广州 | 天仙醉 | 8 |
| 福建福州 | 甜查理 | 28 |
| 福建宁德 | 甜查理 | 15 |
| 江苏扬州 | 紫金早玉 | 5 |
| 江苏徐州 | 宁丰 | 6 |
| 江苏盐城 | 甜查理、香蜜 | 29 |
| 江苏宿迁 | 宁玉 | 8 |
| 江苏南通 | 宁玉 | 8 |
| 江苏连云港 | 宁丰 | 10 |
| 江苏南京 | 宁玉、紫金丽霞 | 12 |

含杀菌剂的 PDA 培养基:用丙酮将苯醚甲环唑母液依次稀释成 $0.50 \times 10^3 \mu\text{g/ml}$ 、 $1.50 \times 10^3 \mu\text{g/ml}$ 和

$3.00 \times 10^3 \mu\text{g/ml}$, 分别吸取上述各质量浓度溶液 400 μl 加入至 399.6 ml 已灭菌且冷却至 50°C 左右的 PDA 培养基中, 制成终质量浓度为 $0.50 \mu\text{g/ml}$ 、 $1.50 \mu\text{g/ml}$ 和 $3.00 \mu\text{g/ml}$ 的含杀菌剂的 PDA 平板。

1.0% 水琼脂培养基 (WA): 琼脂粉 10 g, 加水定容至 1 000 ml, 加热至琼脂完全溶化后分装, 121°C 灭菌 20 min, 备用。

1.5 草莓拟盘多毛孢根腐病菌致病力分析

依据同质园试验 (Common garden experiment) 原理^[15] 在离体感病品种宁玉上进行拟盘多毛孢根腐病菌致病力分析。具体方法: 无菌条件下将从健康植株上采集的大小、叶龄一致的新鲜叶片置于预先备好的 1.0% 水琼脂培养基的培养皿 (直径 10 cm) 中, 每皿放两片叶, 叶背朝上, 用昆虫针在每张叶片背部相同位置刺一直径约 0.50 mm 的针孔。随后用无菌枪头从 PDA 培养基上活化培养 7 d 的菌落边缘取直径为 5 mm 的菌饼, 倒置接种于针孔处。每处理接种 3 皿, 共 6 片叶, 以接种直径为 5 mm 的无菌 PDA 为对照。于恒温 26.0°C 、湿度 95.00%、光照 16 h/黑暗 8 h 的培养箱中培养 48 h 后将叶片翻为正面, 于接种后 2~5 d 内每间隔 24 h 用数码相机固定焦距获取病斑图像。采用 ImageJ1.51 软件进行病斑面积的获取, 对第 5 d 病斑面积和 2~5 d 病情发展曲线下面积 (AUDPC)^[16] 进行分析, AUDPC 参照公式 (1) 计算。

$$AUDPC = \sum_{i=1}^{n-1} \left(\frac{x_{i+1} + x_i}{2} \right) (t_{i+1} - t_i) \quad (1)$$

式 (1) 中 t_i 表示第 i 次获取照片的时间 (d), x_i 表示第 i 次测定时叶片的病斑面积, n 表示病斑面积测定总次数 ($n=4$)。

表 2 供试草莓拟盘多毛孢根腐病菌样本采集地信息
Table 2 Geographic information of sampling locations for *Neopestalotiopsis clavispora*

| 采样地点 | 年平均温度(℃) | 海拔高度(m) | 经度(°) | 纬度(°) | 草莓品种 | 菌株数 |
|------------|----------|---------|--------|-------|------|-----|
| 福州(FZ) | 19.8 | 84.0 | 119.20 | 26.08 | 甜查理 | 13 |
| 呼和浩特(HHHT) | 6.1 | 1 063.0 | 111.60 | 40.82 | 甜查理 | 10 |
| 昆明(KM) | 14.9 | 1 891.0 | 102.60 | 5.02 | 甜查理 | 6 |
| 凉山(LS) | 23.4 | 1 590.0 | 102.20 | 27.90 | 甜查理 | 17 |
| 临沂(LY) | 12.6 | 109.0 | 118.80 | 35.58 | 甜查理 | 18 |
| 盐城(YC) | 14.8 | 6.0 | 120.30 | 32.86 | 甜查理 | 9 |

1.6 草莓拟盘多毛孢根腐病菌对苯醚甲环唑的敏感性测定

采用菌丝生长速率法^[17]进行草莓拟盘多毛孢根腐病菌对苯醚甲环唑的敏感性测定。将表 2 选定的草莓拟盘多毛孢根腐病菌接种在 PDA 平板上预先活化培养 7 d 后,在菌落边缘取直径为 5 mm 的菌饼,分别将菌丝面朝下接种至含 0.50 μg/ml、1.50 μg/ml 和 3.00 μg/ml 苯醚甲环唑的 PDA 平板中心,以含等量丙酮的 PDA 平板为对照(CK),每处理重复 3 次,于 26℃ 恒温培养箱内黑暗培养,自接菌后的第 2~5 d 每间隔 24 h 用数码相机固定焦距后拍照,用 ImageJ 1.51 软件进行菌落直径和菌落面积的获取。以拍摄时间为 x ,当天菌落面积的自然对数为 Y ,用 SLOPE 函数计算得到病原菌的菌丝生长速率^[18]。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%,以菌丝生长抑制率为纵坐标(Y),药剂质量浓度的常用对数值为横坐标(x),求出毒力回归方程和相关系数(r),计算各处理的抑制中浓度(EC_{50})。使用 R 语言 vioplot 工具进行菌丝生长速率概率分布分析,利用 Pearson 相关法^[19]分析菌丝生长速率和致病力间的相关性。

1.7 草莓拟盘多毛孢根腐病菌产孢量测定

试验设计同方法 1.6。在草莓拟盘多毛孢根腐病菌对苯醚甲环唑敏感性试验中,接种培养第 10 d 从 6 个地域来源的菌株中各选取 1 株,共 6 株,进行产孢量测定。具体测定方法为:用打孔器从培养基中心接菌处向外依次呈十字辐射状取一定数量直径为 5 mm 的菌饼,置于加有 5 ml 无菌水的离心管中,并加入 5~8 粒灭菌的玻璃珠,于转速为 200 r/min 的恒温 26℃ 摇床中震荡 20 min,以促进孢子释放。随

后用无菌牙签将病原菌饼取出,于 4 000 r/min 低速离心机中离心 12 min,弃上清液后加入 200 μl 无菌水,于 10×10 倍显微镜下采用血球计数板计算每 1 cm²孢子数,每菌株重复测定 3 次。

2 结果与分析

2.1 草莓拟盘多毛孢根腐病菌的致病力

病斑面积是病原菌致病力的重要特征。草莓离体叶片在接种 73 株拟盘多毛孢根腐病菌后 2~5 d 病斑面积呈不断扩大的趋势(图 2)。不同地域来源的菌株接种后第 5 d 平均病斑面积和 2~5 d AUDPC 分别为 1.65~5.91 cm²和 3.08~13.48。来自凉山的 17 株菌株致病力较强,第 5 d 平均病斑面积和 AUDPC 分别为 5.91 cm²和 15.79,云南昆明的 6 株菌株致病力最弱,第 5 d 平均病斑面积和 AUDPC 分别为 1.65 cm²和 3.08。不同地域来源的菌株,甚至来源同一地域的菌株接种后第 5 d 病斑面积和 AUDPC 存在显著差异,说明不同地域来源甚至来源同一地域的病原菌存在较大的致病力差异(表 3)。随着菌株来源地年平均温度的增加,菌株的 AUDPC 呈增大趋势,即 AUDPC 与菌株来源地的年平均温度呈显著正相关(图 3)。

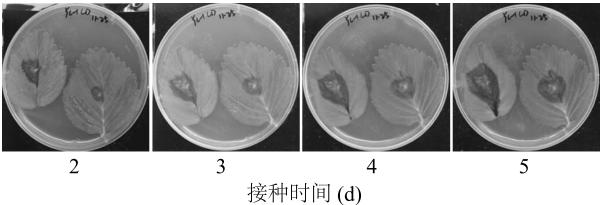


图 2 草莓离体叶片接种草莓拟盘多毛孢根腐病菌菌株 YC-1 后第 2~5 d 的发病症状

Fig.2 Infection symptoms of strawberry leaves during 2-5 d after inoculation with *Neopestalotiopsis clavispora* strain YC-1

表 3 接种不同地域拟盘多毛孢根腐病菌 5 d 后的草莓叶片病斑面积及 2~5 d 病情发展曲线下面积 (AUDPC)

Table 3 The lesion area of strawberry leaves and area under disease progress curve (AUDPC) at 2nd-5th days after inoculation with *Neopestalotiopsis clavispora* crown rot pathogens from different geographical sources

| 菌株采样地点 | 年平均温度 (°C) | 病斑面积 (cm ²) | AUDPC |
|-------------|------------|-------------------------|--------------|
| 福州 (FZ) | 19.8 | 5.56±1.27ab | 13.48±3.87ab |
| 呼和浩特 (HHHT) | 6.1 | 2.11±0.73c | 3.79±1.30c |
| 昆明 (KM) | 14.9 | 1.65±0.45c | 3.08±0.95c |
| 凉山 (LS) | 23.4 | 5.91±1.77a | 15.79±5.11a |
| 临沂 (LY) | 12.6 | 4.38±0.57b | 10.18±3.89b |
| 盐城 (YC) | 14.8 | 2.22±0.99c | 5.37±2.83c |

同列不同小写字母表示不同地区菌株间差异显著 ($P < 0.05$)。

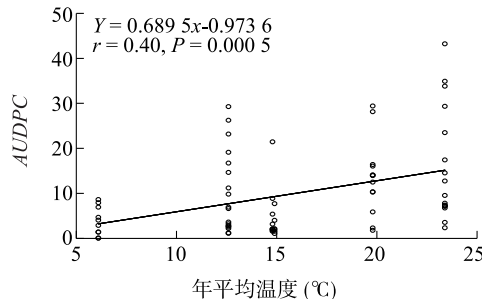


图 3 采样地年平均温度与草莓拟盘多毛孢根腐病菌 2~5 d 病情发展曲线下面积 (AUDPC) 的相关性

Fig.3 Correlation between AUDPC of *Neopestalotiopsis clavispora* and annual mean temperature of sampling sites

2.2 苯醚甲环唑对草莓拟盘多毛孢根腐病菌菌丝生长的影响

图 4 为不同苯醚甲环唑质量浓度对呼和浩特草莓拟盘多毛孢根腐病菌菌株 HHHT-2 接种 5 d 后菌丝生长的影响。从图 4 中可以看出,随苯醚甲环唑质量浓度的增加,草莓拟盘多毛孢根腐病菌生长受到的抑制作用增强。不同苯醚甲环唑质量浓度下,供试的 73 株病原菌菌丝生长速率概率分布如图 5 所示。73 株病原菌最高概率密度所对应的菌丝生长速率及菌丝生长速率均值 (期望值) 随苯醚甲环唑质量浓度的增加逐渐降低。不同地域来源的病原菌菌丝生长速率存在一定的差异 (表 4)。在 CK 以及 0.50 $\mu\text{g/ml}$ 、1.50 $\mu\text{g/ml}$ 、3.00 $\mu\text{g/ml}$ 苯醚甲环唑质量浓度下,病原菌的平均菌丝生长速率分别为 0.96、0.80、0.74 和 0.70。整体来看,来自年平均温度较低地区 (呼和浩特和临沂) 的病原菌生长速率

较快,而来自年平均温度较高地区 (福州和凉山) 的病原菌生长速率较慢。在 CK 以及 0.50 $\mu\text{g/ml}$ 、1.50 $\mu\text{g/ml}$ 、3.00 $\mu\text{g/ml}$ 苯醚甲环唑质量浓度下,病原菌菌丝生长速率与采样地的年平均温度的相关系数分别为 -0.58、-0.53、-0.79 和 -0.92。随苯醚甲环唑质量浓度的增加病原菌菌丝生长速率和年平均温度的负相关性越强,在 3.00 $\mu\text{g/ml}$ 时呈极显著负相关。说明在化学药剂的胁迫下,病原菌的菌丝生长速率受本地年平均温度的影响愈严重。

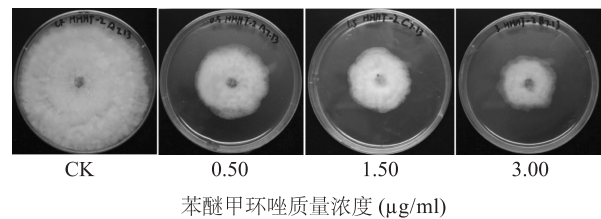


图 4 苯醚甲环唑对草莓拟盘多毛孢根腐病菌 HHHT-2 菌丝生长的抑制作用

Fig.4 Inhibitory effect of difenoconazole on mycelium growth of strawberry crown rot pathogen HHHT-2

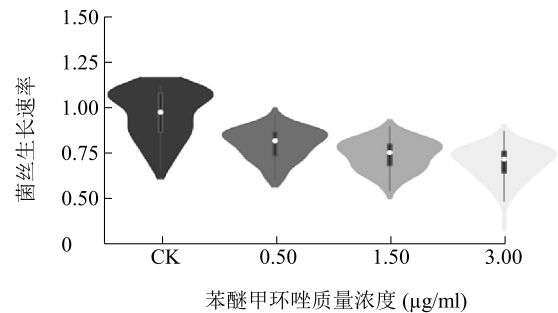


图 5 不同苯醚甲环唑质量浓度下 73 株草莓拟盘多毛孢根腐病菌菌丝生长速率的频率分布

Fig.5 Frequency distribution for mycelium growth rate of 73 *Neopestalotiopsis clavispora* under different mass concentrations of difenoconazole

2.3 草莓拟盘多毛孢根腐病菌对苯醚甲环唑的敏感性

EC_{50} 是体现病原菌对杀菌剂敏感程度的重要指标。苯醚甲环唑对 73 株草莓拟盘多毛孢根腐病菌的 EC_{50} 为 0.01~2.94 $\mu\text{g/ml}$, 平均值为 1.34 $\mu\text{g/ml}$ 。在草莓拟盘多毛孢根腐病菌对苯醚甲环唑的敏感性测定范围内,将 EC_{50} 分为 6 个区间,统计每个区间内的菌株个数及频率,可以看出 73 株草莓拟盘多毛孢根腐病菌对苯醚甲环唑的敏感性频率分布呈单峰变化 (图 6)。 EC_{50} 为 0.51~1.00 $\mu\text{g/ml}$ 区间内菌株分布最

多,其频率值为 24.46%。9 株采集自盐城地区的菌株呈现较高的 EC_{50} (1.63 $\mu\text{g}/\text{ml}$),来自临沂的 18 株菌株呈现较低的 EC_{50} (1.21 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (表 5),说明临沂地区的草莓拟盘多毛孢根腐病菌比盐城地区的对苯醚甲环唑更敏感,可见不同地域来源的病原菌株对苯醚甲环唑的敏感性不同。

表 4 苯醚甲环唑质量浓度对草莓拟盘多毛孢根腐病菌菌丝生长速率的影响

Table 4 Effect of difenoconazole concentration on mycelium growth rate of strawberry *Neopestalotiopsis clavispora* crown rot pathogens

| 菌株采样地点 | 菌丝生长速率 | | | |
|------------|--------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| | CK | 0.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 苯醚甲环唑 | 1.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 苯醚甲环唑 | 3.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 苯醚甲环唑 |
| 福州(FZ) | 0.90b | 0.76b | 0.70c | 0.67c |
| 呼和浩特(HHHT) | 0.99a | 0.81a | 0.78a | 0.74a |
| 昆明(KM) | 0.98a | 0.81a | 0.75ab | 0.71ab |
| 凉山(LS) | 0.96ab | 0.80ab | 0.73bc | 0.67bc |
| 临沂(LY) | 1.01a | 0.83a | 0.77ab | 0.72ab |
| 盐城(YC) | 0.95ab | 0.80ab | 0.74abc | 0.70abc |

同列不同小写字母表示不同地区菌株间差异显著 ($P<0.05$)。

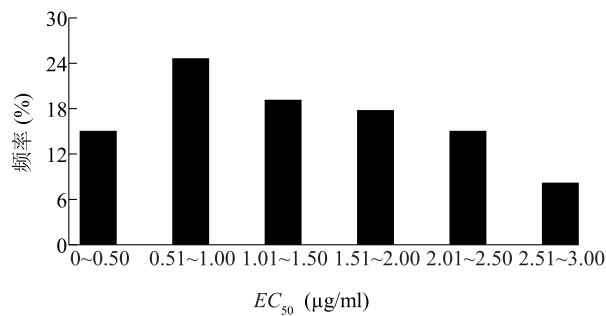


图 6 73 株草莓拟盘多毛孢根腐病菌对苯醚甲环唑敏感性的频率分布

Fig.6 Frequency distribution of sensitivity for 73 *Neopestalotiopsis clavispora* isolates collected from different geographical sources to difenoconazole

表 5 不同地域草莓拟盘多毛孢根腐病菌对苯醚甲环唑的敏感性

Table 5 The sensitivity of *Neopestalotiopsis clavispora* isolates collected from different geographical sources to difenoconazole

| 菌株采样地点 | EC_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$) |
|------------|---------------------------------------|
| 福州(FZ) | 1.43 \pm 0.50 |
| 呼和浩特(HHHT) | 1.22 \pm 0.56 |
| 昆明(KM) | 1.45 \pm 0.60 |
| 凉山(LS) | 1.27 \pm 0.39 |
| 临沂(LY) | 1.21 \pm 0.43 |
| 盐城(YC) | 1.63 \pm 0.49 |

2.4 草莓拟盘多毛孢根腐病菌菌丝生长速率与致病力的相关性

不同苯醚甲环唑质量浓度下,73 株草莓拟盘多

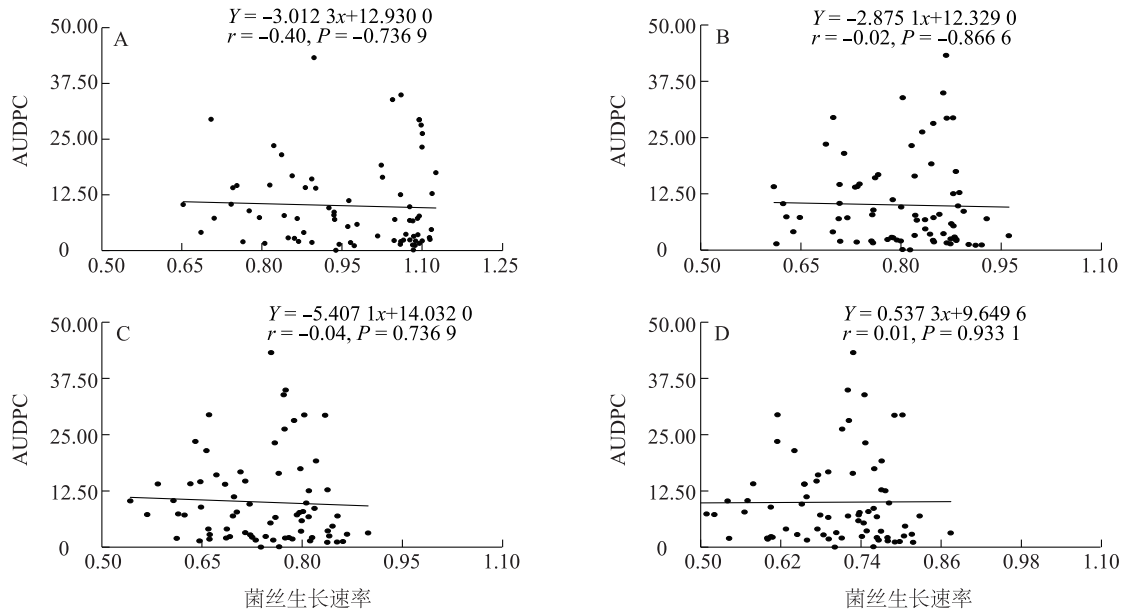
毛孢根腐病菌的菌丝生长速率与其对离体叶片致病力间的相关性分析结果表明,草莓拟盘多毛孢根腐病菌菌丝生长速率与 AUDPC 间相关性不显著(图 7),这说明在侵染寄主植物时菌丝生长速率并不能与致病力直接相关。

2.5 草莓拟盘多毛孢根腐病菌菌丝生长速率与产孢量的相关性

对不同地域来源的 6 株草莓拟盘多毛孢根腐病菌产孢量的分析结果表明,不同地域来源的菌株在不同苯醚甲环唑质量浓度下其产孢量存在一定差异,随苯醚甲环唑质量浓度增加病原菌产孢量下降,在 CK 以及 0.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、3.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 苯醚甲环唑质量浓度下 6 个病原菌平均产孢量分别为 1 cm^2 6.17 个、4.00 个、3.61 个、2.93 个。产孢量与菌丝生长速率的相关性分别为 -0.39, -0.82, -0.92, -0.74。在 0.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 1.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 苯醚甲环唑质量浓度下菌丝生长速率与产孢量均呈显著负相关(图 8)。

3 讨论

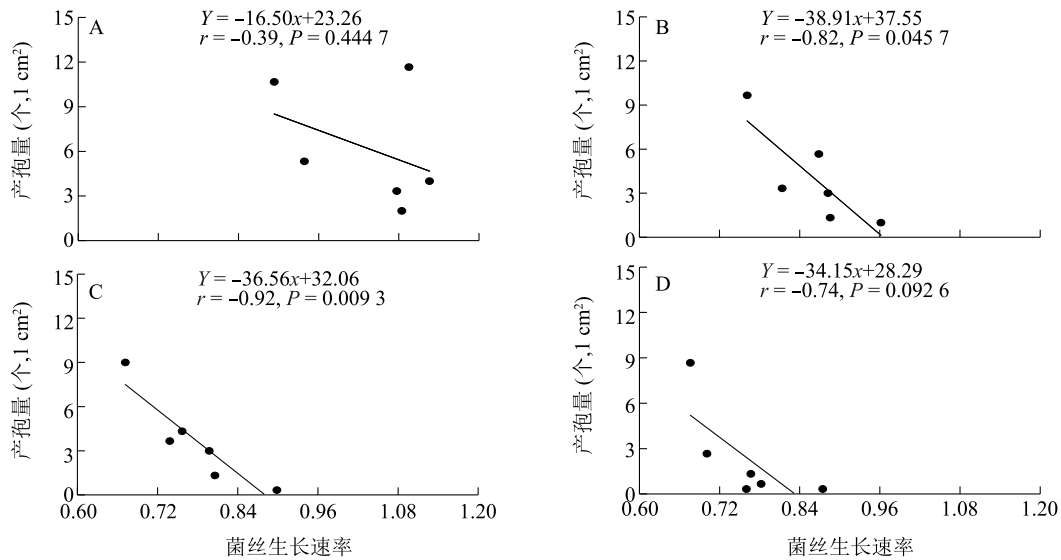
在植物病害的防控过程中,探究植物病原菌与寄主的进化演化规律是病害防控的关键,病原菌的致病力除和自身的生物学特性相关外,同时也受寄主植物与外界环境的共同影响^[18,20]。在全球气候变化的大背景下,病原菌为更好地生存和繁衍会通过迁移或改变自身的适应能力来应对环境的变化。有关病原菌致病力的评价指标多采用潜伏期、发病



A: CK; B: 0.50 $\mu\text{g/ml}$; C: 1.50 $\mu\text{g/ml}$; D: 3.00 $\mu\text{g/ml}$ 。

图 7 不同苯醚甲环唑质量浓度下草莓拟盘多毛孢根腐病菌菌丝生长速率与致病力的相关性

Fig.7 Correlation between AUDPC and mycelium growth rate of *Neopestalotiopsis clavisporea* under different mass concentrations of difenoconazole



A: CK; B: 0.50 $\mu\text{g/ml}$; C: 1.50 $\mu\text{g/ml}$; D: 3.00 $\mu\text{g/ml}$ 。

图 8 不同苯醚甲环唑质量浓度下草莓拟盘多毛孢根腐病菌菌丝生长速率与产孢量的相关性

Fig.8 Correlation between mycelium growth rate and conidia production of *Neopestalotiopsis clavisporea* under different mass concentrations of difenoconazole

率或病斑面积等,本研究基于不同时间病斑面积及 AUDPC 进行评价。研究发现不论是病斑面积还是 AUDPC 对不同地区菌株的致病力评价结果一致,不同地域来源的菌株以及同一地区的菌株个体间致病力存在较大差异,且不同地域菌株间的致病力和样本来源地的年平均温度呈显著正相关(图 3),来

自年平均温度较高地区如福州和凉山的菌株呈现较高的致病力,反之则低。这说明草莓拟盘多毛孢根腐病菌对温度可能存在本地适应性,这与前人在拟盘多毛孢乃至其他病原真菌和卵菌上的研究结果一致^[18,21]。

病原菌的抗药性是指对杀菌剂敏感的植物病原

菌个体或群体长期受到农药的作用引起的^[22-23],由于靶标基因的位点突变以及靶标基因和运输体基因的过量表达等遗传变异呈现出对药剂敏感性下降的现象^[24]。草莓生产上除用苯醚甲环唑防治拟盘多毛孢根腐病外,还用来防控炭疽根腐病(*Colletotrichum crown rot*)和疫霉根腐病(*Phytophthora crown rot*)等一些常见的病原真菌或卵菌病害。由于频繁连续使用苯醚甲环唑,导致生产上用药量逐年上升,已有较多病原菌对苯醚甲环唑产生抗药性的报道^[25-28]。本研究发现不同苯醚甲环唑质量浓度下,不同地域来源的草莓拟盘多毛孢根腐病菌菌丝生长速率存在一定差异,来自年平均温度较低地区(呼和浩特和临沂)的病原菌生长相对较快,敏感性较差,预示着这些采样地的草莓拟盘多毛孢群体中可能存在对该药剂敏感性低的天然耐药菌株。本研究所选菌株样本均为生长期未施用过苯醚甲环唑及其相同作用机制药剂的菌株,整体来看,73株草莓拟盘多毛孢根腐病菌对苯醚甲环唑的敏感性特征(EC_{50})呈单峰曲线,平均 EC_{50} 为1.34 $\mu\text{g/ml}$,同前人^[8,11,29]的研究结果相比敏感性有所降低。因此,在未来使用苯醚甲环唑甚至相同作用机制药剂时应格外重视其抗药性的监测。菌丝生长速率的差异表明草莓拟盘多毛孢根腐病菌可能在侵染寄主时存在致病力的差异,在对其进行致病力测定时发现73株病原菌在致病力上存在显著差异,而致病力差异与菌丝生长速率差异类似,在不同菌株间存在特异性。不同苯醚甲环唑质量浓度下草莓拟盘多毛孢根腐病菌菌丝生长速率和致病力之间不存在相关性,这说明在实际侵染寄主植物时菌丝生长速率并不能与致病力及发病程度直接相关。6株不同地域来源的菌株产孢量也存在较大差异,已有研究结果证明真菌的致病毒素在其致病过程中发挥关键作用,毒素多由孢子萌发产生,一般来讲产孢量多意味着其毒素产生量多,对寄主植物的致病力越强^[30]。本研究发现,不同苯醚甲环唑质量浓度下草莓拟盘多毛孢根腐病菌的菌丝生长速率与产孢量的相关性存在差异,且菌丝生长速率和AUDPC不存在相关性。这可能因为致病力除与毒素产量相关外,还与细胞壁降解酶、主要致病因子多聚半乳糖醛酸酶等多种因素有关造成的^[31]。因此,不同病原菌菌株致病力差异机理尚需进行更深入全面的研究。

总之,考虑到作用机制和降低抗药性风险,建议

生产中应尽量避免苯醚甲环唑等DMI(14 α -脱甲基酶抑制剂)类药剂的单一使用,尽量将其与其他内吸性或者保护性杀菌剂混合或者交替使用,最大限度延长苯醚甲环唑的使用寿命。此外,各地的病原菌在致病力、菌丝生长速率等方面存在一定的差异,因此,还应根据当地的气候环境制定草莓拟盘多毛孢根腐病的区域防控策略,从而实现病害的可持续有效防控。

参考文献:

- [1] LI W, LIU Q. Changes in fungal community and diversity in strawberry rhizosphere soil after 12 years in the greenhouse[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2019, 18(3): 677-687.
- [2] 李梦雅,陈莎莎,王世梅. 连作草莓低发病土壤与高发病土壤理化性质及生物学特征差异比较[J]. 江苏农业学报, 2021, 37(4): 910-918.
- [3] 张运涛,雷家军,赵密珍,等. 新中国果树科学研究70年:草莓[J]. 果树学报, 2019, 36(10): 1441-1452.
- [4] 宁志怨,伊兴凯,兰伟,等. 安徽省‘甜查理’草莓红叶病病原菌的分离与鉴定[J]. 分子植物育种, 2019, 17(15): 5051-5056.
- [5] 刘艳茹,曹莹,孙琰,等. 草莓拟盘多毛孢根腐病病原菌分离与鉴定[J]. 植物病理学报, 2022, 52(1): 104-108.
- [6] 赵景楠,马喆,刘正坪,等. 草莓拟盘多毛孢叶斑病的病原菌[J]. 菌物学报, 2016, 35(1): 114-120.
- [7] 赵宇,钱恒伟,徐鹏程,等. 青岛市草莓根腐病病原菌分离及鉴定[J]. 中国植保导刊, 2016, 36(1): 43-46.
- [8] SHI J, ZHANG X, LIU Y, et al. First report of *Neopestalotiopsis clavispora* causing calyx and receptacle blight on strawberry in China[J]. Plant Disease, 2022, 106(4): 1307.
- [9] 温浩,魏佳爽,张桂军,等. 九种杀菌剂对新拟盘多毛孢病菌的室内毒力作用[J]. 农药学学报, 2019, 21(4): 437-443.
- [10] 宁志怨,伊兴凯,黄锡桂,等. 甜查理草莓红叶病防治药剂筛选的研究[J]. 安徽农业科学, 2020, 48(5): 416-419.
- [11] 刘艳茹. 草莓拟盘根腐病病原菌鉴定及其防治药剂筛选[D]. 沈阳:沈阳农业大学, 2021.
- [12] 李忠峰,王磊,刘金文,等. 郑州地区草莓红斑叶枯病病原鉴定及防治药剂筛选[J]. 农业科技通讯, 2021(8): 231-235.
- [13] ZHANG Y, ZHOU Q, TIAN P Y, et al. Induced expression of CYP51 associated with difenoconazole resistance in the pathogenic *Alternaria* sect. on potato in China[J]. Pest Management Science, 2020, 76(5): 1751-1760.
- [14] 方中达. 植病研究方法(第3版)[M]. 北京:中国农业出版社, 1998: 122-125.
- [15] STEFANSSON T S, WILLI Y, CROLL D, et al. An assay for quantitative virulence in *Rhynchosporium commune* reveals an association between effector genotype and virulence[J]. Plant Pathology, 2014, 63(2): 405-414.

- [16] FRY W E. Quantification of general resistance of potato cultivars and fungicide effects for integrated control of potato late blight[J]. Phytopathology, 1978, 68(11): 1650-1655.
- [17] LI Y, TSUJI S S, HU M, et al. Characterization of difenoconazole resistance in *Lasiodiplodia theobromae* from papaya in Brazil[J]. Pest Management Science, 2020, 76(4): 1344-1352.
- [18] YANG L, ZHU W, WU E, et al. Trade-offs and evolution of thermal adaptation in the Irish potato famine pathogen *phytophthora infestans*[J]. Molecular Ecology, 2016, 25(16): 4047-4058.
- [19] LAWRENCE I, LIN K. A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility[J]. Biometrics, 1989, 45(1): 255-268.
- [20] ZHU W, ZHAN J, MCDONALD B A. Evidence for local adaptation and pleiotropic effects associated with melanization in a plant pathogenic fungus[J]. Fungal Genetics and Biology, 2018, 115: 33-40.
- [21] DUDNEY J, WILLING C E, DAS A J, et al. Nonlinear shifts in infectious rust disease due to climate change[J]. Nature Communications, 2021, 12: 1-13.
- [22] 邹拓, 杜琪, 耿雷跃, 等. 抗除草剂水稻耐药性及后代筛选方法的研究[J]. 江苏农业科学, 2022, 50(13): 136-140.
- [23] 韩洋琳, 李思思, 袁文斌, 等. 云南地区月季灰霉菌致病力及抗药性鉴定[J]. 南方农业学报, 2021, 52(9): 2489-2497.
- [24] 詹家绥, 吴娥娇, 刘西莉, 等. 植物病原真菌对几类重要单位点杀菌剂的抗药性分子机制[J]. 中国农业科学, 2014, 47(17): 3392-3404.
- [25] KIKUHARA K, IIYAMA K, MATSUMOTO M, et al. First report on DMI fungicide resistance in *Gymnosporangium asiaticum*, the causal agent of Japanese pear rust, in Japan[J]. Journal of General Plant Pathology, 2019, 85(1): 49-56.
- [26] HEICK T M, JUSTESEN A F, JøRGENSEN L N. Anti-resistance strategies for fungicides against wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* with focus on DMI fungicides[J]. Crop Protection, 2017, 99: 108-117.
- [27] 韩永超, 向发云, 曾祥国, 等. 湖北省草莓炭疽病菌对苯醚甲环唑的敏感性测定[J]. 植物保护学报, 2016, 43(3): 525-526.
- [28] 史晓晶, 任璐, 王华杰, 等. 山西省番茄早疫病病菌对苯醚甲环唑的敏感性及其抗性突变体的适合度[J]. 植物保护学报, 2019, 46(1): 201-207.
- [29] 薛德胜, 邵兆浩, 李保华, 等. 防治蓝莓棒状拟盘多毛孢菌化学药剂的室内筛选[J]. 山东农业科学, 2018, 50(9): 115-118.
- [30] WANG C, LI C, LI B, et al. Toxins produced by *valsa mali* var. *Mali* and their relationship with pathogenicity[J]. Toxins, 2014, 6(3): 1139-1154.
- [31] 谈彬. 桃褐腐病病原鉴定与多样性研究及其PG基因的克隆与表达[D]. 扬州: 扬州大学, 2019.

(责任编辑: 石春林)