

烟叶米根霉检测、碳源代谢表型及其对 7 种杀菌剂的敏感性

汪汉成^{*1}, 张 敏², 张长青^{*2}, 陈兴江¹, 谭清群³, 马 骏^{*4}, 李 忠⁵

(1. 贵州省烟草科学研究院, 贵阳 550081; 2. 长江大学 农学院, 湖北 荆州 434025; 3. 贵州省植物保护研究所, 贵阳 550006; 4. 贵州省烟草公司 黔西南州公司, 贵州 兴义 562400; 5. 贵州大学 农学院, 贵阳 550025)

摘 要: 采用组织分离法检测了烘烤烟叶霉烂病原菌米根霉 *Rhizopus oryzae*, 采用 Biolog FF 代谢板分析了其碳源代谢表型特征, 并测定了其对 7 种杀菌剂 (多菌灵、异菌脲、咪鲜胺、氟硅唑、丙环唑、苯醚甲环唑和啞菌酯) 的敏感性。结果表明: 米根霉在田间烟叶、编烟杆和编烟绳上的检出率均为 100%。米根霉能代谢和产孢的碳源分别有 66 和 30 种, 主要包括核糖醇、*D*-阿拉伯醇和 β -环式糊精等; 不能代谢和产孢的碳源分别有 29 和 65 种, 包括 α -环式糊精、*L*-海藻糖和*D*-半乳糖醛酸等。7 种杀菌剂对烟草米根霉的菌丝生长均表现出不同的抑制作用, 抑菌活性最强的是氟硅唑和苯醚甲环唑, 其 EC_{50} 值分别为 8.31 和 9.71 mg/L; 其次为丙环唑、异菌脲和咪鲜胺, 其 EC_{50} 值分别为 14.24、32.84 及 > 10 mg/L; 最弱的为啞菌酯和多菌灵, 其 EC_{50} 值均 > 100 mg/L。研究结果可为烘烤烟叶霉烂病化学防治提供参考和依据。

关键词: 烟叶霉烂病; 米根霉; 碳源; 代谢表型; 杀菌剂; 敏感性

中图分类号: S481.9 文献标志码: A 文章编号: 1008-7303(2018)06-0743-06

Pathogen detection, carbon metabolic phenotype analysis of *Rhizopus oryzae* from tobacco and its sensitivity to seven fungicides

WANG Hancheng^{*1}, ZHANG Min², ZHANG Changqing^{*2}, CHEN Xingjiang¹,
TAN Qingqun³, MA Jun^{*4}, LI Zhong⁵

(1. Guizhou Academy of Tobacco Science, Guiyang 550081, China; 2. College of Agriculture, Yangtze University, Jingzhou 434025, Hubei Province, China; 3. Guizhou Institute of Plant Protection, Guiyang 550006, China; 4. Qianxinan Tobacco Company of Guizhou Tobacco Company, Xingyi 562400, Guizhou Province, China; 5. College of Agriculture, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: Pathogen detection of *Rhizopus oryzae*, which causes tobacco pole rot, was conducted using tissue isolation method. The carbon metabolic phenotype of the pathogen was studied with Biolog FF microplate. The sensitivity of *R. oryzae* to seven different fungicides (carbendazim, iprodione, prochloraz, flusilazole, propiconazole, difenoconazole and azoxystrobin) was also evaluated. Results

收稿日期: 2018-06-27; 录用日期: 2018-09-20.

基金项目: 贵州省科技支撑计划 (黔科合支撑 20182356); 贵州省烟草公司黔西南州公司科技项目 (201703); 贵州省科技厅优秀青年人才培养计划 (黔科合平台人才 20175619); 中国烟草总公司贵州省公司科技项目 (201412, 201711, 201714).

作者简介: *汪汉成, 通信作者 (Author for correspondence), 男, 博士, 研究员, 主要从事植物保护及烟草微生物学研究, **E-mail:** xiaobaiyang126@hotmail.com; *张长青, 共同通信作者 (Co-author for correspondence), 男, 博士, 教授, 主要从事植物病害综合防治研究, **E-mail:** qingchangzhang@163.com; *马骏, 共同通信作者 (Co-author for correspondence), 男, 硕士, 农艺师, 主要从事烟草植物保护研究, **E-mail:** 25858147@qq.com

showed that the detection ratios of *R. oryzae* from samples of tobacco leaves, tobacco baking stick and tobacco baking rope were all 100%. The numbers of carbon for metabolization and sporulation of *R. oryzae* were 66 and 30, respectively, which included ribitol, *D*-arabitol, β -cyclodextrin, etc. While for no-metabolization and no-sporulation carbons, the numbers were 29 and 65, respectively, which included α -cyclodextrin, *L*-trehalose, *D*-galacturonic acid, etc. All the seven fungicides showed different inhibitory activities against the mycelial growth of *R. oryzae*. Highest sensitivities were detected when flusilazole and difenoconazole were applied, with EC_{50} values of 8.31 and 9.71 mg/L, respectively. And EC_{50} values of propiconazole, iprodione and prochloraz were 14.24, 32.84 and > 10 mg/L, respectively. While carbendazim and azoxystrobin have the lowest activities with the EC_{50} values > 100 mg/L. Results of this study provided reference and basis for the chemical control of tobacco pole rot.

Keywords: tobacco pole rot; *Rhizopus oryzae*; carben; metabolic phenotype; fungicide; sensitivity

烟叶霉烂病 (tobacco pole rot) 是烟草烘烤和储存过程中易发生的一种真菌性病害, 其病原菌为米根霉 *Rhizopus oryzae* Went et Pr. Geerl. [1-3]。该病害具有爆发性强和危害性大的特点, 且一旦发病扩展迅速, 会很快传播到附近烤房, 导致烤后烟叶质量下降, 产量降低[4]。近年来, 烘烤烟叶霉烂病在贵州省遵义市、毕节市、黔南州和黔西南州等烟叶主产区的发生逐年加重, 但其病原菌的来源尚不清楚。此外, 该病害主要在烟叶烘烤期发生, 而烘烤期是烟叶脱水和碳水化合物转化的关键时期, 由此推测某些碳水化合物 (碳源) 可能是米根霉生长的重要营养物质, 对其侵染烘烤期烟叶起着重要作用。目前对于烟叶霉烂病的防治尚无有效手段。Biolog FF 代谢板含有 95 种不同的碳源, 可用于快速进行微生物碳源代谢表型的研究, 其主要原理是根据四唑类氧化还原染料的色度变化来指示微生物对碳源的利用程度[5]。鉴于此, 笔者分别采用组织分离法、Biolog FF 代谢板等就烘烤烟叶霉烂病病原菌的侵染来源、其碳源代谢表型特征及防治药剂的筛选等进行了初步研究, 现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 培养基和仪器

采用真菌培养基 AEA^[6] (酵母粉 5 g/L, KH_2PO_4 6 g/L, $NaNO_3$ 6 g/L, KCl 0.50 g/L, $MgSO_4$ 0.25 g/L, 甘油 20 mL/L, 琼脂粉 20 g/L, 加去离子水定容至 1 L, 灭菌后待用)。Biolog FF 代谢板 (#1006)、接种液 FF-IF (#72106)、OmniLog PM 系统 (#91171)、Turbidimeter (#3531) 及 8 多通道电动移液器 (#3501A), 美国 Biolog 公司。

1.2 供试菌株

在贵州省烟草公司黔西南州公司烤房内采集病害样品, 参照 Wang 等[1]的方法进行病原菌的分离及纯化, 结合病原菌的形态学特征和分子生物学鉴定结果将所得菌株鉴定为米根霉 *Rhizopus oryzae*。选取菌株 Y5 (CCTCC M 2015720) 于 4 °C 下、AEA 培养基斜面上保存, 用于碳源代谢表型分析和杀菌剂敏感性测定研究。

1.3 杀菌剂

80% 多菌灵 (carbendazim) 原药, 江苏蓝丰生物化工股份有限公司; 97.30% 异菌脲 (iprodione) 原药, 泰安圣聚华有限公司; 99.10% 咪鲜胺 (prochloraz) 原药, 江苏辉丰农化股份有限公司; 95.30% 氟硅唑 (flusilazole) 原药, 南通柯林化学品有限公司; 95% 丙环唑 (propiconazole) 原药, 江苏丰登农药有限公司; 96.80% 苯醚甲环唑 (difenoconazole) 原药, 山东寿光双星农药有限公司; 96.80% 啞菌酯 (azoxystrobin) 原药, 先正达 (中国) 投资有限公司。将多菌灵溶于 0.20 mol/L 的稀盐酸, 异菌脲溶于丙酮, 其余药剂溶于甲醇中, 均配成 1.0×10^4 mg/L 的母液, 于 4 °C 黑暗条件下保存, 备用。试验时将上述药液加入至 50 °C 左右的 AEA 培养基中, 制成含药平板, 其中丙酮、盐酸或甲醇的体积分数均小于 0.25%。以在无药培养基中加入相同体积分数丙酮、稀盐酸或甲醇的处理作为空白对照。

1.4 病原菌检测

于烟叶烘烤期, 分别采集鲜烟叶 (品种: 云烟 85) 的茎柄和烟叶、编烟杆及编烟绳样品各 2 份。称取各样品 2 g, 分别放入盛有 100 mL 无菌水的 250 mL 三角瓶中, 在摇床中于 25 °C、170 r/min 下培养 2 h。分别吸取 100 μ L 振荡液, 涂布接种

于 AEA 平板上, 置于 25 ℃ 黑暗条件下培养, 5 d 后观察平板上是否有米根霉菌落形成。

1.5 碳源代谢表型分析

采用 Biolog 公司的 FF 代谢板进行米根霉碳源代谢表型分析, 参照 FF 板操作指南进行^[5]。在 AEA 平板上培养米根霉直至产孢。用无菌棉签蘸取米根霉孢子, 溶于 FF-IF 接种液中制备孢子溶液, 调整孢子溶液的浊度为 75%T (T 为 Biolog 浊度液测定单位)。将孢子溶液倒入 V 型加样槽中, 吸取 100 μL 孢子液加入 FF 代谢板的所有孔中, 置于恒温培养箱中, 于 28 ℃ 下培养 120 h。设置 OmniLog 工作软件, 采用 Biolog D5E_OKA_data.exe 软件收集米根霉在生长过程中代谢板孔内颜色变化值, 采用 Biolog OL_FM_1.2.exe 软件分析其代谢图谱^[7], 根据代谢图谱中的面积值评价米根霉对 FF 代谢板中 95 种碳源的代谢情况, 并观察米根霉在 FF 代谢板相应碳源上的产孢情况。

1.6 杀菌剂敏感性测定

采用菌丝生长速率法^[8]测定。菌株预培养 5 d 后, 在菌落边缘打取直径 5 mm 的菌碟, 接种于直径为 9 cm、含系列质量浓度药剂的 AEA 平板上, 每处理重复 3 次。其中, 多菌灵、咪鲜胺及啞菌酯的最终质量浓度均为 0、1、10 和 100 mg/L, 异菌脲、氟硅唑、丙环唑及苯醚甲环唑的最终质量浓度均为 0、0.78、1.56、3.13、6.25、12.50、25、50 和 100 mg/L。接菌后将平板置于 28 ℃、黑暗条件下培养。当对照菌落直径接近 2/3 培养皿直径时, 采用十字交叉法测量各处理菌落直径, 计算各杀菌剂对病原菌菌丝生长的抑制率^[9]。

1.7 数据处理

采用 Microsoft Excel 2010 软件处理, 以药剂质量浓度的对数值为横坐标、抑制率几率值为纵坐标绘制毒力回归曲线, 计算毒力回归方程及有效抑制中浓度 (EC₅₀) 值。采用 DPS (7.05) 软件进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 病原菌检测

检测结果显示, 所制备的烟叶、烟柄、编烟杆及编烟绳共 8 份样品的菌悬液经过 5 d 培养, 在 AEA 平板上均发现了米根霉菌落, 样品病原菌的检出率均为 100%。

2.2 碳源代谢表型分析

米根霉经 Biolog FF 代谢板培养 120 h 后, 其

对 95 种碳源的代谢表型特征及其在代谢板内的产孢情况见表 1。由表中数据可知, 米根霉的碳源代谢表型特征和其产孢情况间均存在较大差异。其能够代谢的碳源有 66 种, 包括各种单糖、多糖和氨基酸类; 不能代谢的碳源有 29 种, 主要有 *N*-乙酰基-β-*D*-甘露糖胺、α-环式糊精、*L*-海藻糖、*D*-半乳糖醛酸及 *m*-肌醇等。能促使米根霉产孢的碳源有 30 种, 包括 *N*-乙酰基-β-*D*-葡萄糖胺、核糖醇、*D*-阿拉伯醇和β-环式糊精等; 不能促使其产孢的碳源有 65 种, 包括 *N*-乙酰基 *D*-半乳糖胺、*D*-阿拉伯糖、α-环式糊精和 *L*-海藻糖等。

2.3 米根霉对 7 种杀菌剂的敏感性

结果 (表 2) 显示, 在测试浓度范围内, 供试 7 种杀菌剂对烟草米根霉的菌丝生长表现出不同的抑制作用, 其中: 抑制活性最强的是氟硅唑和苯醚甲环唑, 其 EC₅₀ 值分别为 8.31 和 9.71 mg/L, EC₉₀ 值分别为 26.70 和 34.56 mg/L; 其次为丙环唑、异菌脲和咪鲜胺, 其 EC₅₀ 值分别为 14.24、32.84 及 > 10 mg/L; 最弱的为啞菌酯和多菌灵, EC₅₀ 值均 > 100 mg/L。

3 讨论

烟叶在烘烤过程中一般需要经历变黄期、定色期和干筋期 3 个阶段, 由米根霉引起的烘烤烟叶霉烂病通常在变黄期出现并产生危害, 其主要原因是该病原菌为高温致病菌, 其菌丝生长最适合的温度约为 37 ℃, 而变黄期恰在 37 ℃ 左右持续的时间较长, 为病害的发生创造了条件^[10]。本研究结果显示, 在鲜烟叶、烟柄、编烟绳及编烟杆上均检测到了米根霉, 表明该病原菌在自然环境中广泛存在, 推测其初始来源为田间烟草叶片, 在烟叶烘烤过程中, 被米根霉侵染的烟叶会产生大量菌丝和孢子, 产生的孢子会随着气流扩散并感染至周围烤房环境中, 而被污染的编烟绳和编烟杆因继续用于后续烟叶的烘烤, 会造成多次循环侵染。为此, 烟叶烘烤过程中应加强环境和烟叶烘烤工具的消毒。

本研究还发现, 尽管在田间烟叶样品上检测到了米根霉, 但该病原菌在田间并不为害烟叶, 仅侵染烘烤期的烟叶, 其侵染机理目前尚不清楚。推测除烘烤期的温度因子外, 烟叶组织内的碳水化合物对该病害的发生也可能起到积极作用。烘烤过程中, 烟叶中的淀粉会转化为葡萄糖、果糖、麦芽糖、蔗糖及氨基酸类等多种碳源^[11-13], 而本研

表 1 米根霉在 Biolog FF 代谢板上的碳源利用和产孢情况

Table 1 Result of carbon substrate utilization and sporulation of *Rhizopus oryzae* on Biolog FF microplate

碳源 Carbon	代谢 ^a Metabo- lization ^a	米根霉 产孢情况 ^b Sporulation ^b	碳源 Carbon	代谢 ^a Metabo- lization ^a	米根霉 产孢情况 ^b Sporulation ^b	碳源 Carbon	代谢 ^a Metabo- lization ^a	米根霉 产孢情况 ^b Sporulation ^b
水 Water	—	—	乳果糖 Lactulose	—	—	γ -羟基丁酸 <i>\gamma</i> -hydroxybutyri acid	+	—
吐温-80 Tween-80	+	+	麦芽糖醇 Maltitol	—	—	<i>p</i> -羟苯乙酸 <i>p</i> -Hydroxy-phenylacetic acid	—	—
<i>N</i> -乙酰基- <i>D</i> -半乳糖胺 <i>N</i> -Acetyl- <i>D</i> - galactosamine	++	—	麦芽糖 Maltose	+++	+++	α -酮戊二酸 <i>\alpha</i> -Ketoglutaric acid	+++	—
<i>N</i> -乙酰基- β - <i>D</i> -葡萄糖胺 <i>N</i> -Acetyl- β - <i>D</i> - glucosamine	+++	+++	麦芽三糖 Maltotriose	+++	++	<i>D</i> -乳酸甲基酯 <i>D</i> -Lactic acid methyl ester	++	—
<i>N</i> -乙酰基- β - <i>D</i> -甘露糖胺 <i>N</i> -Acetyl- β - <i>D</i> - mannosamine	—	—	<i>D</i> -甘露醇 <i>D</i> -Mannitol	+	++	<i>L</i> -乳酸 <i>L</i> -Lactic acid	++	—
核糖醇 Adonitol	+	++	<i>D</i> -甘露糖 <i>D</i> -Mannose	+++	++	<i>D</i> -苹果酸 <i>D</i> -Malic acid	+++	—
杏苷 Amygdalin	+	—	<i>D</i> -松三糖 <i>D</i> -Melezitose	—	—	<i>L</i> -苹果酸 <i>L</i> -Malic acid	+++	—
<i>D</i> -阿拉伯糖 <i>D</i> -Arabinose	++	—	<i>D</i> -蜜二糖 <i>D</i> -Melibiose	—	—	奎尼酸 Quinic acid	—	—
<i>L</i> -阿拉伯糖 <i>L</i> -Arabinose	++	++	α -甲基- <i>D</i> -半乳糖苷 <i>\alpha</i> -Methyl- <i>D</i> -galactoside	—	—	<i>D</i> -葡萄糖二酸 <i>D</i> -Saccharic acid	+++	—
<i>D</i> -阿拉伯醇 <i>D</i> -Arahitol	+++	+++	β -甲基- <i>D</i> -半乳糖苷 β -Methyl- <i>D</i> -galactoside	+	—	癸二酸 Sebacic acid	++	+
熊果苷 Arbutin	+++	+	α -甲基- <i>D</i> -葡萄糖苷 <i>\alpha</i> -Methyl- <i>D</i> -glucoside	+	—	琥珀酰氨基酸 Succinamic acid	—	—
<i>D</i> -纤维二糖 <i>D</i> -Cellobiose	+++	++	β -甲基- <i>D</i> -葡萄糖苷 β -Methyl- <i>D</i> -glucoside	+++	+++	琥珀酸 Succinic acid	+++	—
α -环式糊精 α -Cyclodextrin	—	—	异麦芽酮糖 Palatinose	+	+	琥珀酸甲基酯 Succinic acid mono-methyl ester	—	—
β -环式糊精 β -Cyclodextrin	+	+++	<i>D</i> -阿洛酮糖 <i>D</i> -Psicose	+	—	甲基酰- <i>L</i> -谷氨酸 <i>N</i> -Acetyl- <i>L</i> -glutamic acid	++	—
糊精 Dextrin	++	++	<i>D</i> -蜜三糖 <i>D</i> -Raffinose	—	—	<i>L</i> -丙氨酸酰胺 <i>L</i> -Alaninamide	+++	—
<i>i</i> -赤藓糖醇 <i>i</i> -Erythritol	+	—	<i>L</i> -鼠李糖 <i>L</i> -Rhamnose	—	—	<i>L</i> -丙氨酸 <i>L</i> -Alanine	+++	—
<i>D</i> -果糖 <i>D</i> -Fructose	+++	++	<i>D</i> -核糖 <i>D</i> -Ribose	++	—	<i>L</i> -丙氨酸氨基乙酸 <i>L</i> -Alanylglycine	+++	—
<i>L</i> -海藻糖 <i>L</i> -Fucose	—	—	水杨苷 Salicin	++	+	<i>L</i> -天冬酰胺 <i>L</i> -Asparagine	+++	—
<i>D</i> -半乳糖 <i>D</i> -Galactose	+++	—	景天庚醛聚糖 Sedoheptulosan	—	—	<i>L</i> -天冬氨酸 <i>L</i> -Aspartic acid	+++	—
<i>D</i> -半乳糖醛酸 <i>D</i> -Galacturonic acid	—	++	<i>D</i> -山梨醇 <i>D</i> -Sorbitol	+++	+++	<i>L</i> -谷氨酸 <i>L</i> -Glutamic acid	+++	—
龙胆二糖 Gentiobiose	+++	+++	<i>L</i> -山梨糖 <i>L</i> -Sorbose	—	++	甘氨酸- <i>L</i> -谷氨酸 Gycyl- <i>L</i> -glutamic acid	+++	—
<i>D</i> -葡萄糖酸 <i>D</i> -Gluconic acid	+++	—	水苏糖 Stachyose	++	—	<i>L</i> -鸟氨酸 <i>L</i> -Ornithine	+++	+
<i>D</i> -葡萄糖胺 <i>D</i> -Glucosamine	—	—	蔗糖 Sucrose	—	—	<i>L</i> -苯基柄氨酸 <i>L</i> -Phenylalanine	+++	—
α - <i>D</i> -葡萄糖 α - <i>D</i> -Glucose	+++	++	<i>D</i> -塔格糖 <i>D</i> -Tagatose	++	—	<i>L</i> -脯氨酸 <i>L</i> -Proline	+++	++

续表 1

Table 1 (Continued)

碳源 Carbon	代谢 ^a Metabo- lization ^a	米根霉 产孢情况 ^b Sporulation ^b	碳源 Carbon	代谢 ^a Metabo- lization ^a	米根霉 产孢情况 ^b Sporulation ^b	碳源 Carbon	代谢 ^a Metabo- lization ^a	米根霉 产孢情况 ^b Sporulation ^b
<i>α</i> -D-葡萄糖-1-磷酸钾盐 <i>α</i> -D-Glucose-1-phosphate	++	—	<i>D</i> -海藻糖 <i>D</i> -Trehalose	+++	+++	<i>L</i> -焦谷氨酸 <i>L</i> -Pyroglutamic acid	—	—
葡萄糖酰胺 Glucuronamide	—	—	松二糖 Turanose	—	—	<i>L</i> -丝氨酸 <i>L</i> -Serine	+++	—
<i>D</i> -葡萄糖酸 <i>D</i> -Glucuronic acid	+	—	木糖醇 Xylitol	+++	+++	<i>L</i> -苏氨酸 <i>L</i> -Threonine	+++	—
丙三醇 Glycerol	+++	+++	<i>D</i> -木糖 <i>D</i> -Xylose	+++	++	2-氨基乙醇 2-Aminoethanol	—	—
肝糖 Glycogen	++	+	γ -氨基丁酸 γ -Aminobutyric acid	+	—	腐苣 Putrescine	—	—
<i>m</i> -肌醇 <i>m</i> -Inositol	—	—	溴代琥珀酸 Bromosuccinic acid	—	—	腺苷 Adenosine	—	—
2-酮- <i>D</i> -葡萄糖酸 2-Keto- <i>D</i> -gluconic acid	—	—	反丁烯二酸 Fumaric acid	+++	—	尿苷 Uridine	++	—
<i>α</i> -D-乳糖 <i>α</i> -D-Lactose	—	—	β -羟基丁酸 β -Hydroxybutyric acid	++	—	腺苷-5'-磷酸盐 Adenosine-5'- monophosphate	+++	—

注: ^a “—”、“+”、“++”及“+++”分别表示米根霉不能代谢、较弱代谢、较强代谢及强代谢所供试碳源; ^b “—”、“+”、“++”及“+++”分别表示米根霉不能产孢、产孢量少、产孢量较多及产孢量多。

Note: ^a “—”, “+”, “++” and “+++” means that *R. oryzae* could not utilize the tested carbon substrate, utilized poorly, moderately and effectively, respectively. ^b “—”, “+”, “++” and “+++” means that *R. oryzae* could not sporulate, sporulated poorly, moderately or effectively, respectively.

表 2 7 种杀菌剂对米根霉菌丝生长的抑制作用

Table 2 Inhibitory effects of seven fungicides on the mycelial growth of *Rhizopus oryzae* from tobacco

杀菌剂 Fungicide	毒力回归方程 Toxicity regression equation	相关系数 <i>r</i>	EC ₅₀ /(mg/L)	EC ₉₀ /(mg/L)
异菌脲 iprodione	$y = 1.16x + 3.24$	0.98	32.84	>100
苯醚甲环唑 difenoconazole	$y = 2.33x + 2.70$	0.99	9.71	34.56
丙环唑 propiconazole	$y = 2.31x + 2.34$	0.99	14.24	51.14
氟硅唑 flusilazole	$y = 2.53x + 2.67$	0.99	8.31	26.70
咪鲜胺 prochloraz	—	—	>10	—
啉菌酯 azoxystrobin	—	—	>100	—
多菌灵 carbendazim	—	—	>100	—

注: “—”表示未能计算出。Note: “—” means result could not be calculated.

究通过 Biolog FF 碳源代谢表型研究发现, 米根霉能够代谢葡萄糖、麦芽糖、糊精等糖类碳源, 某些碳源可能促进了米根霉的侵染与定殖。此外, 烘烤时的高温影响了烟叶的生理生化状态^[14], 其状态的改变可能为米根霉的侵染创造了条件。相关推测有待进一步研究。

本研究通过 Biolog FF 碳源代谢表型分析, 明确了米根霉可代谢及产孢的碳源种类、促进其生长且不能产孢的碳源种类及其不能代谢和不能产孢的碳源种类。研究结果对指导米根霉的防控与利用具有重要意义。有关烟叶叶片在烘烤过程中

碳源的种类目前还不完全清楚, 可能含有促进米根霉生长和产孢的碳源, 有待进一步开展相关研究。

米根霉除为害烘烤期烟草叶片外, 还能侵染百合、红枣等植物组织^[15-16], 但有关其防治技术的研究报道较少。李润根等^[15]测定了源自龙牙百合的米根霉对申喹毒素 (phenazine-1-carboxylic acid) 和己唑醇 (hexaconazole) 的敏感性, 发现己唑醇的抑制活性最强; 刘艳祥对由米根霉引起的红枣软腐病进行了研究, 同样发现己唑醇的抑菌活性最强^[16]。本研究测定了 7 种杀菌剂对米根霉菌丝生长的毒力, 发现氟硅唑、苯醚甲环唑及丙环唑的

抑制活性较强，这 3 种杀菌剂与己唑醇均为同类作用机制的药剂，即抑制细胞膜甾醇生物合成^[17]，因此认为这类药剂应该可以用于由米根霉引起的烘烤期烟叶腐烂病的防治，有关其防治技术及包括己唑醇在内的其他药剂的筛选有待进一步研究。

4 结论

本研究检测了烟草烤房环境样品的烟叶霉烂病病原菌米根霉，分析了其碳源代谢表型特征，并测定了其对 7 种杀菌剂的敏感性。研究发现，米根霉广泛存在于田间烟叶、编烟杆及编烟绳中。该病原菌能代谢和产孢的碳源分别有 66 和 30 种，主要包括核糖醇、*D*-阿拉伯醇和 β -环式糊精等；不能代谢和产孢的碳源分别有 29 和 65 种，包括 α -环式糊精、*L*-海藻糖和*D*-半乳糖醛酸等。7 种杀菌剂对烟草米根霉的菌丝生长均表现出不同的抑制作用，抑菌活性最强的是氟硅唑和苯醚甲环唑，其次为丙环唑、异菌脲和咪鲜胺，最弱的为啞菌酯和多菌灵。研究结果可为烘烤烟叶霉烂病化学防治提供参考和依据。

参考文献 (Reference):

[1] WANG H C, HUANG Y F, TANG X G, et al. Leaf and stem rot of tobacco (*Nicotiana tabacum*) caused by *Rhizopus oryzae* in closed curing barns in Guizhou Province of China[J]. *Plant Dis*, 2016, 100(2): 536.

[2] 曾婷英, 顾钢, 张绍升. 烘烤期烟叶霉烂病的病原鉴定[J]. *中国烟草学报*, 2014, 20(4): 65-68.

ZENG T Y, GU G, ZHANG S S. Pathogen identification of tobacco leaf mildew rot during flue-curing[J]. *Acta Tabacaria Sinica*, 2014, 20(4): 65-68.

[3] KORTEKAMP A, SCHMIDTKE M, SERR A. Infection and decay of tobacco caused by *Rhizopus oryzae*/Die Infektion und Fäulnis von Tabak verursacht durch *Rhizopus oryzae*[J]. *Z Für Pflanzenkrankheit Und Pflanzensch/J Plant Dis Prot*, 2003, 110(6): 535-543.

[4] SCHIPPER M A A. A revision of the genus *Rhizopus* I: the *Rhizopus stolonifer*-group and *Rhizopus oryzae*[J]. *Stud Mycol*, 1984, 25: 1-19.

[5] WANG H C, WANG J, LI L C, et al. Metabolic activities of five botryticides against *Botrytis cinerea* examined using the Biolog FF MicroPlate[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 31025.

[6] 汪汉成, 周明国, 张艳军, 等. 戊唑醇对立枯丝核菌的抑制作用及在水稻上的应用[J]. *农药学学报*, 2007, 9(4): 357-362.

WANG H C, ZHOU M G, ZHANG Y J, et al. Fungicidal activity of tebuconazole against *Rhizoctonia solani* and its application to rice[J]. *Chin J Pestic Sci*, 2007, 9(4): 357-362.

[7] 汪汉成, 黄艳飞, 龙明锦, 等. 烟草青枯病菌与其拮抗菌解淀粉芽孢杆菌的代谢表型差异分析[J]. *植物保护学报*, 2017, 44(5): 753-762.

WANG H C, HUANG Y F, LONG M J, et al. Analysis of the difference in metabolic phenotypes between *Ralstonia solanacearum* from tobacco and its antagonistic bacterium *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. *J Plant Prot*, 2017, 44(5): 753-762.

[8] 唐正合, 汪汉成, 王建新, 等. 丙环唑对水稻纹枯病菌的抑制作用及对纹枯病的防治效果[J]. *植物保护*, 2012, 38(1): 158-161.

TANG Z H, WANG H C, WANG J X, et al. Fungicidal activity of propiconazole to *Rhizoctonia solani* and its control efficacy against rice sheath blight[J]. *Plant Prot*, 2012, 38(1): 158-161.

[9] SUN H Y, WANG H C, CHEN Y, et al. Multiple resistance of *Botrytis cinerea* from vegetable crops to carbendazim, diethofencarb, procymidone, and pyrimethanil in China[J]. *Plant Dis*, 2010, 94(5): 551-556.

[10] 张玉琴, 李青山, 王传义, 等. 烤烟烟叶成熟过程中的颜色参数与烘烤特性研究[J]. *西南农业学报*, 2018, 31(1): 62-67.

ZHANG Y Q, LI Q S, WANG C Y, et al. Study on color parameters and curing characteristics of flue-cured tobacco leaves in process of maturity[J]. *Southwest China J Agric Sci*, 2018, 31(1): 62-67.

[11] 赵会纳, 蔡凯, 秦嘉, 等. 烟叶烘烤前后主要代谢产物的差异分析[J]. *烟草科技*, 2017, 50(9): 61-67.

ZHAO H N, CAI K, QIN J, et al. Variance analysis of main metabolites in tobacco leaves before and after curing[J]. *Tob Sci Technol*, 2017, 50(9): 61-67.

[12] 李春艳, 聂荣邦. 烟叶烘烤过程中部分化学成分的动态变化研究进展[J]. *作物研究*, 2005(S1): 390-394.

LI C Y, NIE R B. Research advance in dynamic changes of partial chemicals during the tobacco leaves curing[J]. *Crop Res*, 2005(S1): 390-394.

[13] 宋朝鹏, 孙福山, 许自成, 等. 烤烟调制过程中淀粉精细结构的研究进展[J]. *中国烟草科学*, 2010, 31(1): 70-73.

SONG Z P, SUN F S, XU Z C, et al. Research advance in fine structure of tobacco starch during curing[J]. *Chin Tob Sci*, 2010, 31(1): 70-73.

[14] 宋朝鹏, 魏硕, 贺帆, 等. 利用低场核磁共振分析烘烤过程烟叶水分迁移干燥特性[J]. *中国烟草学报*, 2017, 23(4): 50-55.

SONG Z P, WEI S, HE F, et al. Analysis of moisture migration and drying characteristics of tobacco during flue-curing by low field NMR[J]. *Acta Tabacaria Sinica*, 2017, 23(4): 50-55.

[15] 李润根, 艾芬婷. 龙牙百合软腐病病原-米根霉的分离鉴定及杀菌剂室内毒力测定初报[J]. *中国植保导刊*, 2017, 37(11): 10-14.

LI R G, AI F T. Isolation, identification and inhibition test of *Rhizopus oryzae* from soft rot disease on Longya lily[J]. *China Plant Prot*, 2017, 37(11): 10-14.

[16] 刘艳祥. 新疆红枣果实两种真菌病害病原鉴定及关键防治技术研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2016.

LIU Y X. Research between pathogens identification and key control techniques of two Jujube fruit fungal diseases in Xinjiang[D]. Urumchi: Xinjiang Agricultural University, 2016.

[17] DIMOPOULOU M, VERHOEF A, PENNING S J L A, et al. Embryotoxic and pharmacologic potency ranking of six azoles in the rat whole embryo culture by morphological and transcriptomic analysis[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2017, 322: 15-26.

(责任编辑: 金淑惠)