

华南地区瓜类疫霉对甲霜灵的田间抗药性

吴永官^{1,2}, 陆少峰², 黄思良^{3*}, 付岗², 陈亮⁴, 谢大森⁵, 黎起秦¹, 岑贞陆²

¹广西大学农学院, 南宁 530005

²广西农业科学院, 南宁 530007

³南阳师范学院生命科学与技术学院, 南阳 473061

⁴长江大学农学院, 荆州 434025

⁵广东省农业科学院蔬菜研究所, 广州 510640

摘要 【目的】了解华南地区瓜类疫霉(*Phytophthora melonis*)对甲霜灵的田间抗药性。【方法】2007–2010年从广西、广东两省(区)9个市冬瓜和黄瓜产区采集疫病样品,分离纯化瓜类疫霉,分别采用菌落生长速率法和叶盘漂浮法测定瓜类疫霉对甲霜灵的敏感性,并用药剂驯化方法从敏感性菌株诱导瓜类疫霉抗甲霜灵突变体。【结果】从9个市24个样点共分离纯化获得193株瓜类疫霉,抗药性检测结果表明,敏感菌株、中等抗性菌株和抗性菌株分别占测试菌株的29.0%、18.1%和52.8%;不同地区、不同寄主分离的菌株的抗性频率和抗性水平差异较大,来源于广东的菌株抗性频率和抗性水平一般高于来源广西的菌株,分离自黄瓜的菌株高于分离自冬瓜的菌株,大部分样点抗性菌株占据优势群体,个别菌株的抗性指数高达4226.9,叶盘漂浮法测定结果和菌落生长速率法相似;在含药平板上对敏感菌株进行甲霜灵抗性诱导结果表明,从60%的敏感菌株中成功诱导出对甲霜灵抗性稳定的突变体,突变体的抗性水平为敏感性亲本的189–407倍;9株来源于未施用过甲霜灵等苯基酰胺类杀菌剂样点的菌株均为敏感性菌株,其 EC_{50} 值为0.0429–0.5461 $\mu\text{g}/\text{mL}$,将它们 EC_{50} 的平均值 $0.3200 \pm 0.1617 \mu\text{g}/\text{mL}$ 确定为华南地区瓜类疫霉对甲霜灵的敏感性基线;对两个样点的监测结果表明,瓜类疫霉抗甲霜灵菌株的频率及抗性指数有逐年增高趋势。【结论】华南广西和广东两省(区)瓜类疫霉对甲霜灵抗性普遍发生,瓜类疫霉对甲霜灵抗药性产生与其和药剂的接触密切相关。瓜类疫霉敏感性基线的建立,可为今后瓜类疫霉抗甲霜灵的评价和进一步监测提供科学依据。

关键词: 瓜类疫霉, 甲霜灵, 抗药性, 敏感性基线, 检测

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2011) 08-1078-09

由瓜类疫霉(*Phytophthora melonis* Katsura)引起的瓜类疫病是冬瓜和黄瓜产区最严重的侵染性病害之一,从苗期到成株期均可发生,主要为害植株的茎、叶及果实。该病菌存活于土壤之中,潜育期短,传播速度快,侵染力强,对植物破坏性大。在温湿度

适合的情况下在极短时间内导致病害大流行,给瓜类生产造成巨大损失^[1–5]。

目前对该病害的防治主要以化学防治为主^[6]。

甲霜灵(metalaxyl)又名瑞毒霉、甲霜安、雷多米尔等,具有优良的保护、治疗和铲除作用而广泛应用于

基金项目: 广西农业科学院科技发展基金(200916); 基本科研业务专项基金项目(201017); 广西区财政厅项目[桂财预函(2008)119号]

* 通信作者。Tel/Fax: +86-377-63513641; E-mail: silianghuang@126.com

作者简介: 吴永官(1978–),男,博士研究生,主要从事瓜菜病虫害防治研究。E-mail: wuyongguan@tom.com

收稿日期: 2011-01-25; 修回日期: 2011-04-11

瓜类疫病的防治,也是其他卵菌病害防治的常用药剂之一。甲霜灵属苯基酰胺类杀菌剂,其作用机制主要是特异地抑制病原菌核糖体 RNA 聚合酶,从而抑制 RNA 的合成^[7],由于作用位点单一,在连续施用多年后,病原菌容易产生抗药性^[8]。甲霜灵于1977年投入使用以来,1980年首先在爱尔兰、荷兰、瑞士等国家检测到抗甲霜灵的致病疫霉(*Phytophthora infestans*)菌株,之后相继在欧洲、北美洲、中美洲、亚洲及中东等地陆续报道了疫霉菌(*Phytophthora* spp.)对甲霜灵抗药性的发生^[8-14]。在中国,开展疫霉菌对甲霜灵抗药性的研究起步较晚,但近年来在致病疫霉、烟草疫霉(*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*)和辣椒疫霉(*Phytophthora capsici*)对甲霜灵的抗药性研究日益增多^[15-19]。戚仁德等^[15]对安徽省辣椒疫霉进行甲霜灵抗药性测定表明,敏感、低中抗和抗性菌株的分离频率分别为63.2%、30.4%和6.4%,抗性菌株所占比例较小;朱桂宁等^[16]对采集自广西8个冬春植番茄区的239个番茄晚疫病菌株进行了测定,结果表明,对甲霜灵表现为敏感、低中抗和抗性菌株的频率分别为42.26%、35.98%和23.53%,表明广西的番茄晚疫病已产生抗药性群体;曹继芬等^[19]对124株云南番茄致病疫霉的甲霜灵敏感性测定表明,抗性、中抗和敏感菌株分别占测定菌株的51.2%、31.7%和17.1%,抗性菌株已上升为优势种群。作者^[20-21]曾进行过广西黑皮冬瓜疫霉的室内药剂筛选和盆栽试验,发现病原菌对甲霜灵的敏感性降低,盆栽防治效果明显下降,意味着广西瓜类疫霉可能对甲霜灵存在抗药性。目前国内外均未见瓜类疫霉菌对甲霜灵抗药性的研究报道。广西、广东是我国最大的冬瓜种植和供应基地,但随着复种指数的提高,冬瓜疫病的发生也进一步加剧,尤其在高温多雨的生长季节,发病更加严重和频繁,药剂防治也收效甚微,该病害已经成为制约冬瓜生产的瓶颈^[2]。因此,生产上急需了解冬瓜主产区瓜类疫霉是否对甲霜灵产生抗药性及其抗性程度。本研究从广西、广东主要冬瓜(部分黄瓜)产区广泛采集瓜类疫霉样品,分离、检测瓜类疫霉对甲霜灵的敏感性,建立华南地区瓜类疫霉对甲霜灵的敏感性基线,并定点连续数年采样监测瓜类疫霉对甲霜灵抗药性的变化趋势,以期对瓜类疫病的防控提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株:2007-2010年从广西南宁(22°16′-23°9′N,107°59′-108°33′E)、崇左(22°31′-23°34′N,107°47′-107°48′E)、柳州(24°13′-24°32′N,109°14′-109°20′E)、桂林(25°14′-25°31′N,110°13′-110°16′E)、玉林(22°11′-22°40′N,109°59′-110°10′E)和广东广州(22°48′N,113°25′E)、英德(24°16′-24°16′N,113°8′-113°16′E)、台山(22°4′-22°7′N,112°49′-112°50′E)、佛山(23°27′N,112°54′E)共9个市的24个村(镇)采集冬瓜、黄瓜上具典型疫病症状植株样品400余份,记录每份样品的采集地点、日期、寄主、耕作制度及化学防治情况等信息。用选择性培养基分离、纯化病原菌,经鉴定共获得瓜类疫霉193株,菌株的分离和鉴定参照郑小波的方法^[1]进行,菌株来源及寄主详见表1。

1.1.2 主要药剂与培养基:98.3%甲霜灵原药,由浙江一帆化工有限公司生产,原药先用少量丙酮溶解,然后配制成浓度为100 mg/mL的母液待用。马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)^[1]。

1.1.3 供试植物:冬瓜品种“桂蔬一号”由广西农业科学院蔬菜研究所提供,种植于大棚内,待植株长至20叶左右时取中部叶龄相近、大小一致的叶片,用打孔器打成直径为70 mm的叶盘供试。

1.2 菌株保存

将纯化后的菌株接种到PDA斜面上,室温培养2 d后置于15℃的冰箱保存,每3个月转接1次。

1.3 供试菌株对甲霜灵敏感性测定

1.3.1 离体测定:采用菌落生长速率法^[15],供试菌株在PDA平板上培养5 d,于菌落边缘取直径5 mm的菌丝块,分别移到含甲霜灵0、5和100 μg/mL的PDA平板中央,28℃培养4-6 d,待不含甲霜灵平板上的菌落(空白对照)长至直径5 cm时,用垂直十字架法测量含药平板上的菌落直径。供试菌株对甲霜灵的敏感性划分参考Parra的标准^[10],即在含5 μg/mL甲霜灵的PDA上菌落直径小于空白对照40%的为敏感性菌株(sensitive strain,简称SS);在含5 μg/mL甲霜灵的PDA上菌落直径大于空白对照40%,但在含100 μg/mL甲霜灵的PDA上菌落直

表 1 不同样区瓜类疫霉对甲霜灵的敏感性

Table 1 Sensitivity of the *Phytophthora melonis* to metalaxyl from different sampling areas

Sampling area	No. of strains tested	Host	SS ^a		MRS ^b		RS ^c	
			Number	Frequency / %	Number	Frequency / %	Number	Frequency / %
Nanning (南宁)	51	Wax gourd	23	45. 1	7	13. 7	21	41. 2
	14	Cucumber	2	14. 3	2	14. 3	10	71. 4
Liuzhou(柳州)	6	Wax gourd	4	66. 7	1	16. 7	1	16. 7
	3	Cucumber	1	33. 3	0	0	2	66. 7
Chongzuo(崇左)	9	Wax gourd	3	33. 4	2	22. 2	4	44. 4
Guilin(桂林)	22	Wax gourd	7	31. 8	5	22. 7	10	45. 5
Yulin(玉林)	60	Wax gourd	14	23. 3	11	18. 3	35	58. 3
Guangzhou(广州)	5	Wax gourd	0	0	1	25	4	75
Yingde(英德)	8	Wax gourd	1	12. 5	3	37. 5	4	50
Foshan(佛山)	6	Wax gourd	0	0	1	16. 7	5	83. 3
Taishan(台山)	9	Wax gourd	1	11. 1	2	22. 2	6	66. 7
Total	193		56	29. 0	35	18. 1	102	52. 8

^a Sensitive strains. ^b Moderately resistant strains. ^c Resistant strains.

径小于空白对照 40% 的菌株为中等抗性菌株 (moderately resistant strain , 简称 MRS) ; 在含 100 μg/mL 甲霜灵的 PDA 上菌落直径超过空白对照 40% 的菌株为抗性菌株 (resistant strain , 简称 RS) 。

1.3.2 活体测定: 采用叶盘漂浮法进行活体测定^[18] , 随机选取 12 株 SS、10 株 MRS 和 16 株 RS , 分别检测其对甲霜灵的敏感性。在直径 9 cm 的培养皿内分别加入 25 mL 浓度 0. 1、1. 0、10. 0、100. 0 μg/mL 的甲霜灵药液 , 以加入灭菌去离子水为对照 , 将直径 70 mm 的冬瓜叶盘背面朝上置于药液中 , 每皿 1 片 , 浸泡 2 h 后 , 把在 PDA 上培养 5 d 的供试菌株用打孔器切取直径 5 mm 的菌饼置于每叶盘中心 (菌丝面朝下紧贴叶面) , 每处理 9 个叶盘 , 重复 3 次 , 置 28℃ 培养 72 h , 按 Schwinn 等的分级标准^[22] 调查病情 , 计算病情指数和防治效果。

1.4 供试菌株对甲霜灵抗性水平的测定及敏感性基线的建立

根据 1.3.1 的测定结果 , 将 RS 和 MRS 分别移到含甲霜灵 0、2. 5、5、10、20、40、80、160、320、640、1280、2560 μg/mL 的 PDA 平板上 , SS 分别移到含甲霜灵 0、0. 005、0. 01、0. 05、0. 1、0. 5、1. 0、5. 0、10. 0 μg/mL 的 PDA 平板上 , 并使各浓度中所含丙酮的量一致 , 置于 28℃ 条件下培养 , 4 – 6 d 后测量菌落直径 , 每处理设 3 个重复。通过菌丝生长抑制率的机率值和甲霜灵的浓度对数之间的线性回归分析 , 求出各菌株的毒力回归方程、相关系数和 EC₅₀ 值。

敏感性基线的确定参照文献^[15, 23] , 在对不同地区瓜类疫霉对甲霜灵的敏感性进行测定后 , 取未曾

施用过甲霜灵样点的 SS 进行测定 , 将多个 SS 的 EC₅₀ 平均值确定为瓜类疫霉对甲霜灵的敏感性基线。

各菌株的抗性水平用抗性指数 (菌株的 EC₅₀ 值与敏感性基线的 EC₅₀ 值之比) 表示。

1.5 野生 SS 的甲霜灵抗性诱变及其突变体的抗性水平测定

为了明确野生 SS 在与药剂接触后是否会发生抗药性分化 , 分析瓜类产区抗甲霜灵瓜类疫霉菌株发生的原因 , 参照文献 [24] 的方法进行野生 SS 抗甲霜灵诱变实验: 将供试菌株在 PDA 平板上 28℃ 下培养 5 d , 再移入含甲霜灵 10 μg/mL 的 PDA 平板上诱变。每培养皿接种 4 块大小约 10 mm × 10 mm × 3 mm 的菌丝块 , 每菌株接种 10 个培养皿。接种后的培养皿用 Parafilm 封口 , 置 28℃ 培养。7 d 后每隔 2 – 3 d 观察菌丝块生长情况 , 当供试菌株在含药 PDA 平板上产生快速生长角变区后 , 将各菌株的快速生长角变区分别移至不含甲霜灵的 PDA 平板上培养 , 在不含甲霜灵的 PDA 培养基中转接 3 – 4 次后 , 再接种到含甲霜灵 10 μg/mL 的 PDA 平板上 , 能正常生长的 , 则视为抗甲霜灵 (M_r⁺) 突变体。参照 1.4 的方法 , 分别测定野生型亲本及其 M_r⁺ 突变体的抗性指数。

2 结果和分析

2.1 供试菌株对甲霜灵的敏感性

2.1.1 离体检测: 2007 – 2010 年从广西、广东两省 (区) 9 个市冬瓜和黄瓜产区 24 个样点采集的 400

余份疫病样品中共分离获得 193 株瓜类疫霉,测定了全部菌株对甲霜灵的敏感性。结果表明,RS 为 102 株,占测试菌株的 52.8%,属优势群体;SS 为 56 株,占 29.0%;MRS 为 35 株,占 18.1%(表 1)。从表 1 可以看出,不同样区 RS 频率有较大差别,广东佛山、台山、广州、英德和广西玉林这 5 个冬瓜产区以及广西南宁、柳州 2 个黄瓜产区 RS 频率较高(50%–83.3%),为优势群体;而来自广西南宁、桂林、崇左及柳州等地的 RS 频率相对较低(16.7%–45.5%)。从寄主作物看(图 1-A),黄瓜的 RS 频率(70.6%)明显高于冬瓜(51.1%);从地域看(图 1-B),广东的 RS 频率(67.9%)显著高于广西(50.3%)。分析各地的相关作物的种植情况,可以看出:RS 频率与当地相关作物的种植历史及甲霜灵的施用情况密切相关,RS 频率较高的样区(如:佛山市大塘镇、台山市冲蒺镇及玉林市新桥镇等)均是相关寄主作物种植时间较长、甲霜灵用药次数(年限)较多(较长)的地区;相反,RS 频率较低的样区(如:南宁市南晓镇、柳州市凤山镇及桂林市定江镇等)均是相关作物种植年限较短、甲霜灵用药次数(年限)较少(较短)的地区。

2.1.2 活体检测:利用叶盘漂浮法对 38 个瓜类疫霉菌株进行了甲霜灵敏感性的活体检测,结果表明,相同浓度的甲霜灵对离体条件下敏感性不同的菌株的平均防治效果差异显著,离体检测中表现敏感的菌株在活体检测中仍表现为敏感(病斑扩展速度慢、病斑面积小),离体检测中表现为中等抗性 & 抗性的菌株在活体生测中多表现为抗性(病斑扩展速度快、病斑面积大);如在 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度下,甲霜灵对 SS 的防治效果已达 64.3%,10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和

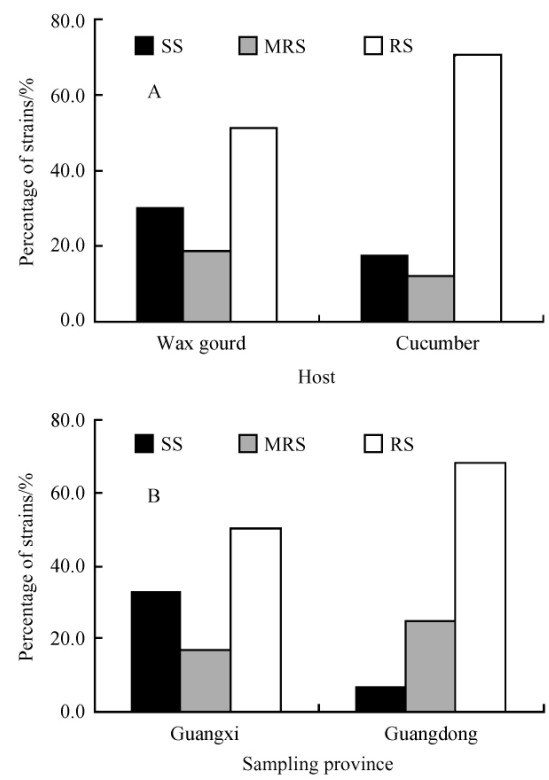


图 1 不同寄主 (A) 和采样省区 (B) 的瓜类疫霉菌株对甲霜灵的敏感性比较
Fig. 1 Comparison of metalaxyl sensitivity between the *Phytophthora melonis* strains isolated from different hosts (A) and from different provinces (B).

100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的防治效果分别为 93.9% 和 100%,而 MRS 和 RS 即使在 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 高浓度下防治效果较低,仅分别为 80.9% 和 52.2%,活体与离体检测结果相一致(表 2)。该结果表明,瓜类疫霉对甲霜灵抗药性的强弱与甲霜灵对瓜类疫病的防治效果高低呈负相关。

表 2 甲霜灵对不同敏感性瓜类疫霉的室内防治效果

Table 2 Control efficacy of matalaxyl against the <i>Phytophthora melonis</i> with different sensitivites to the fungicide <i>in vitro</i>						
Type of strain ^a	No. of strains tested	Average efficacy of metalaxyl against <i>Phytophthora melonies</i> ^b /%				
		CK	0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$
SS	12	—	33.1A	64.3A	93.9A	100.0A
MRS	10	—	25.4B	46.3B	57.6B	80.9B
RS	16	—	16.1C	28.0C	38.0C	52.2C

^a SS, MRS and RS represent sensitive, moderately resistant and resistant strains, respectively. ^b Values are the means of three replicates. Means in a column with different capital letters are significantly different according to Duncan's range test at $P=0.01$.

2.2 瓜类疫霉野生菌株对甲霜灵的敏感性基线
在对甲霜灵敏感性检测的基础上,分别测定了不同样点瓜类疫霉菌株的 EC_{50} 值,结果发现,来自未施用甲霜灵的南宁市南晓镇台马村样点(22°16′

N, 108°29′E) 的 9 株冬瓜疫霉均为 SS(其他样点均有不同程度抗感性菌株的分化),通过对这 9 株 SS 的 EC_{50} 进行反复测定,它们的 EC_{50} 值范围在 0.0429–0.5461 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间,均值为 $0.3200 \pm 0.1617 \mu\text{g}/\text{mL}$

(表3)。由于南宁市南晓镇台马村样点的瓜类疫霉菌株SS经反复测定的EC₅₀均值(0.3200 ± 0.1617 μg/mL)作为华南地区瓜类疫霉对甲霜灵的敏感性基线。

表3 无苯基酰胺类杀菌剂施用记录样点的瓜类疫霉对甲霜灵的敏感性

Table 3 Metalaxyl sensitivities of the *Phytophthora melonis* strains from a sampling site where no phenylamide fungicide application was recorded

Strain ^a	Regression equation ^b	Coefficient (r)	EC ₅₀ / (μg/mL)	Average EC ₅₀ / (μg/mL)
NN-1	Y = 5.4063 + 1.1803 X	0.9826	0.4527	0.3200 ± 0.1617
NN-2	Y = 5.7277 + 0.5321 X	0.9796	0.0429	
NN-3	Y = 5.4409 + 1.2949 X	0.9790	0.4565	
NN-4	Y = 5.2939 + 0.5964 X	0.9656	0.3216	
NN-5	Y = 5.3017 + 1.1483 X	0.9839	0.5461	
NN-6	Y = 5.5392 + 1.1838 X	0.9904	0.3504	
NN-7	Y = 5.4859 + 1.0118 X	0.9756	0.3309	
NN-8	Y = 5.5757 + 0.9840 X	0.9759	0.2600	
NN-9	Y = 5.5093 + 0.5506 X	0.9716	0.1189	

^a The strains were isolated from the samples of Taima village ,Nanxiao township in Nanning city (南宁市南晓镇台马村) where no phenylamide fungicide application was recorded. ^b Y and X represent the probability of growth inhibition rates of each strain by metalaxyl and the log₁₀ value of metalaxyl concentration ,respectively.

2.3 瓜类疫霉对甲霜灵的EC₅₀值及抗性水平

对193株瓜类疫霉进行了甲霜灵的EC₅₀测定,供试瓜类疫霉的不同菌株对甲霜灵的敏感性差异较大。其中56株SS的EC₅₀为0.0429 – 1.3419 μg/mL,菌株之间EC₅₀相差大,最大值是最小值的31倍,其中49株(87.5%)的EC₅₀分布在0.1 – 0.99 μg/mL内;35株MRS的EC₅₀为13.7999 – 88.4706 μg/mL,最大值是最小值的6倍,EC₅₀较为集中;102株RS的EC₅₀为96.3968 – 1352.6135 μg/mL,菌株之间的EC₅₀变化范围较大,最大值是最小值的14倍,EC₅₀基本呈连续状态分布,但仍以100 – 199 μg/mL范围居多,为45株

(44.1%),其次在200 – 299 μg/mL范围的18株(17.6%),超过1000 μg/mL的4株(3.9%)(表4,图2)。进一步分析发现,来源于不同样区的菌株对甲霜灵的平均EC₅₀值及抗性水平存在明显差异,平均EC₅₀为31.6960 – 600.2936 μg/mL,最大值是最小值的近20倍,其中瓜类疫霉的平均EC₅₀超过200 μg/mL的样区为广东的佛山、台山、广州、英德和广西的玉林5个冬瓜产区以及来自广西南宁、柳州的2个黄瓜产区,其中部分菌株(如YL-45)的抗性指数高达4226.9(其EC₅₀为1352.6135 μg/mL),其他样区瓜类疫霉的平均EC₅₀均在200 μg/mL以下(表4)。

表4 不同样区的瓜类疫霉菌株对甲霜灵的抗性水平

Table 4 Metalaxyl-resistant levels of *Phytophthora melonis* strains from different sampling areas

Sampling area	No. of strains tested	EC ₅₀ / (μg /mL) ^a				Average resistance index ^b
		SS	MRS	RS	Average	
Nanning(南宁)	51 ^c	0.0429 – 1.0030	13.7999 – 70.1981	100.3162 – 493.8753	84.4845	264.0
	14 ^d	0.7580 – 1.3419	86.5215 – 87.6105	139.3569 – 1179.1843	302.6543	945.8
Liuzhou(柳州)	6 ^c	0.0948 – 1.0296	75.5003	112.5323	31.6960	99.1
	3 ^d	0.4432	—	265.2011 – 653.2382	306.2942	957.2
Chongzuo(崇左)	9 ^c	0.1817 – 0.2081	25.1690 – 46.7057	164.8949 – 560.7992	131.7939	411.9
Guilin(桂林)	22 ^c	0.2110 – 0.7158	38.6897 – 84.7166	109.9920 – 382.2395	92.3357	288.5
Yulin(玉林)	60 ^c	0.1822 – 1.1538	22.8179 – 88.4706	96.3968 – 1352.6135	254.9521	796.7
Guangzhou(广州)	5 ^c	—	63.7983	266.7232 – 988.5555	431.9225	1349.8
Yingde(英德)	8 ^c	0.3479	59.5723 – 82.6926	248.3770 – 660.3812	232.0840	725.3
Foshan(佛山)	6 ^c	—	66.0330	517.5289 – 1034.1889	600.2936	1875.9
Taishan(台山)	9 ^c	0.2806	69.3489 – 81.5091	220.5518 – 873.1300	292.6248	914.5

^a SS ,MRS and RS represent sensitive , moderately resistant and resistant strains , respectively. ^b Resistance index = EC₅₀ of test strain(mutant) /EC₅₀ of baseline. ^c The strains were isolated from the diseased samples of wax gourd. ^d The strains were isolated from the diseased samples of cucumber.

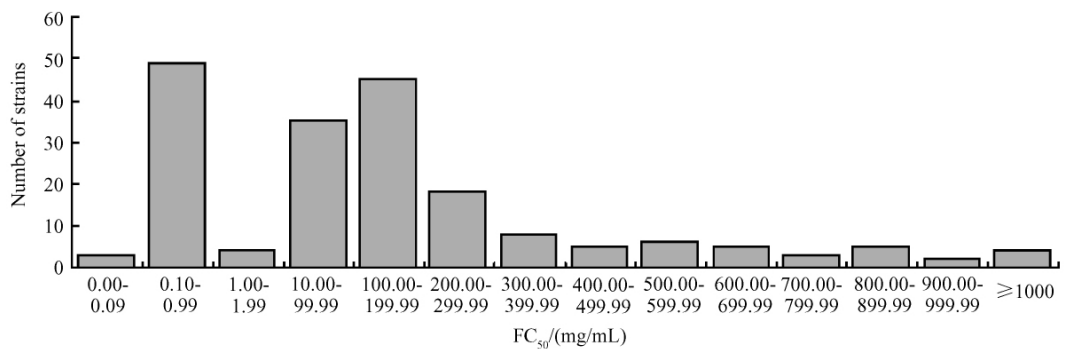


图2 瓜类疫霉菌株对甲霜灵的 EC₅₀ 分布

Fig. 2 EC₅₀ distribution of the *Phytophthora melonis* strains to metalaxyl.

2.4 瓜类疫霉对甲霜灵的田间抗性监测

连续数年分别监测了玉林市玉州区太阳村(2007 – 2010 年) 和南宁市南晓镇雅王村(2008 – 2010 年) 瓜类疫霉对甲霜灵的敏感性, 结果表明, 从这两个监测点不同年份分离的瓜类疫霉菌株的平均 EC₅₀ 逐年上升, RS 频率逐年增高, 显示出当地瓜类

疫霉对甲霜灵的敏感性呈逐年下降趋势。4 年间玉林市玉州区太阳村监测点的瓜类疫霉 RS 频率上升了 20.5 个百分点, 平均 EC₅₀ 提高了 1.84 倍; 3 年间南宁市南晓镇雅王村监测点的瓜类疫霉 RS 频率上升了 28.2 个百分点, 平均 EC₅₀ 提高了 2.08 倍(表 5)。

表5 不同监测点瓜类疫霉对甲霜灵的敏感性变化

Table 5 Change of *Phytophthora melonis* in metalaxyl sensitivity at different monitoring sites

Monitoring sites ^a	Year	No. of strains tested	SS/% ^b	MRS/% ^c	RS/% ^d	EC ₅₀ /(μg /mL)	
						Range	Mean
A	2007	11	27.3	18.2	54.5	0.1822 – 677.0486	177.8121
	2008	9	33.3	11.1	55.6	0.1894 – 705.8741	196.9800
	2009	14	14.3	21.4	64.3	0.2575 – 1352.6135	297.9298
	2010	12	16.7	8.3	75.0	0.3939 – 1121.1881	326.9354
B	2008	12	50.0	16.7	33.3	0.0439 – 253.6659	66.3162
	2009	11	36.4	9.1	54.5	0.1017 – 344.2344	100.0978
	2010	13	23.1	15.4	61.5	0.2214 – 493.8753	138.2169

^a Monitoring sites A and B are located at Taiyang village, Yuzhou district, Yulin city, Guangxi (广西玉林市玉州区太阳村) (22°40'N, 110°10'E) and Yawang village, Nanxiao township, Nanning city, Guangxi (广西南宁市南晓镇雅王村) (22°22'N, 108°30'E), respectively. ^b Sensitive strains. ^c Moderately resistant strains. ^d Resistant strains.

2.5 瓜类疫霉突变体对甲霜灵的抗性水平

5 株供试 SS 在含甲霜灵 10 μg/mL 的 PDA 平板上培养 12 – 18 d 后 4 株产生快速角变区。切取快速生长角变区的先端菌丝体, 分别移至不含甲霜灵的 PDA 平板上, 连续转移 2 – 3 次后转接至含甲霜灵 10 μg/mL 的 PDA 平板上, 发现有 3 株在含药平板上能生长良好, 即为抗甲霜灵(M_r⁺) 突变体, 另外 1 株生长受到抑制。对 3 株瓜类疫霉 M_r⁺ 突变体及其野生型亲本进行对甲霜灵敏感性测定, 3 株 M_r⁺ 突变体的抗性指数较其亲本分别提高了 189、348 和 407 倍(表 6)。表明瓜类疫霉在甲霜灵选择压下生长容易分化出 M_r⁺ 突变体, 部分突变体的抗药性不稳定, 经多次在不含甲霜灵的 PDA 上传代保存后, 其抗性较

易丧失, 另一部分突变体对甲霜灵的抗性较稳定。

3 结论和讨论

本实验用叶盘漂浮法就部分瓜类疫霉菌株对甲霜灵的抗药性进行了测定, 并对此方法进行部分修改, 前人^[15–16,18]所用的叶盘直径为 14 mm, 在接种 5 – 6 d 后通过观察叶盘上产生孢子囊覆盖面积或病斑面积来评价菌株对甲霜灵的敏感性, 本实验中, 因瓜类疫霉在植物组织中扩展速度较快, 在叶面上的扩展速度约 15 – 20 mm/24 h, 同时瓜类疫霉在病斑上一般不产生孢子囊, 因此, 在进行测定时, 将叶盘的直径扩大到 70 mm, 接种 3 d 后通过病斑面积、病

表 6 抗甲霜灵(M_i^r) 突变体对甲霜灵的抗性水平Table 6 Resistant levels of M_i^r mutant of *Phytophthora melonis* to metalaxyl

M_i^r mutant / Wild type ^a	Regression equation ^b	Coefficient (r)	EC ₅₀ / (μ g/mL)	Resistance index ^c
MRNN-5	$Y = 3.6853 + 0.6528 X$	0.9919	103.1024	322.2
NN-5	$Y = 5.3017 + 1.1483 X$	0.9839	0.5461	1.7
MRNN-21	$Y = 3.0885 + 0.9778 X$	0.9910	90.1230	281.6
NN-21	$Y = 5.9072 + 1.3855 X$	0.9940	0.2214	0.7
MRNN-25	$Y = 3.1640 + 1.1597 X$	0.9848	263.6942	824.0
NN-25	$Y = 5.1599 + 1.3287 X$	0.9911	0.7580	2.4

^a The M_i^r mutants MRNN-5, MRNN-21 and MRNN-25 were isolated from the wild type parent strains NN-5, NN-21 and NN-25, respectively. The wild type parent strains were derived from the samples collected from Nanning city (南宁市). ^b Y and X represent the probability of growth inhibition rates of each strain by metalaxyl and the log₁₀ value of metalaxyl concentration, respectively. ^c Resistance index = EC₅₀ of test strain (mutant) / EC₅₀ of baseline.

情指数来计算防治效果,最后叶盘漂浮法的测定结果与菌落生长速率法相比在菌株的抗性类别的划分上基本一致。由此作者认为,本研究采用的叶盘漂浮法适用于瓜类疫霉对甲霜灵及相同作用机制的其他苯基酰胺类杀菌剂的抗药性测定。另外在实验过程中,发现有部分菌株在使用叶盘漂浮法进行测定时防治效果相近,但在使用菌落生长速率法测定时得到的 EC₅₀ 值相差较大,如在叶盘漂浮法测定中,甲霜灵(100 μ g/mL) 对菌株 YL-36 和 LY-54 的防治效果分别为 40.7% 和 42.6%,两菌株间的防效相差不到 2 个百分点,但在菌落生长速率法测定中它们的 EC₅₀ 分别为 705.8741 μ g/mL 和 343.9376 μ g/mL,相差 1 倍多,其原因可能是某些菌株的生长特性在离体和植物体内是不同的^[8],部分报道也认为甲霜灵能诱导植物体产生植保素^[25]和提高植物体内多酚氧化酶活性^[26]等原因而使离体与活体检测结果有偏差,即便如此,叶盘漂浮法大体上并不影响对瓜类疫霉的甲霜灵敏感性级别划分及抗药性监测。

本研究对广西、广东两省(区)的 9 个样区的瓜类疫霉进行甲霜灵的抗药性检测,结果表明,所有样区均检测到 RS 的存在,其中绝大部分样区 RS 占据了优势类群,不同样区 RS 频率及其抗药性水平差异较大,其中 RS 频率和菌株抗性指数较高的样区均出现在苯基酰胺类杀菌剂施药频繁、相关作物种植年限较长、疫病发生较重、用药历史较久的地区,如广东的佛山、台山、广州、英德及广西的玉林是我国最早的冬瓜种植基地,部分样区冬瓜规模种植历史可以追溯到上世纪的 80 年代初,因种植面积大、

复种指数高、雨季湿度大,疫病时常大发生,使得甲霜灵的使用范围广、频率高、用量大、历史长,其结果导致 RS 频率增高。同理,与冬瓜相比,南宁和柳州郊区的黄瓜种植年限较长、生长周期较短,单位时间内甲霜灵的施用量和施用次数较多而使 RS 频率增高(RS 频率均在 50% 以上);而 RS 频率和菌株抗性指数较低的样区均出现在苯基酰胺类杀菌剂施药次数少、相关作物种植年限较短的地区,包括广西南宁、崇左、柳州及桂林的冬瓜种植区。因此,作者认为瓜类疫霉对甲霜灵抗药性的产生与我国主要瓜类产区长期频繁施用甲霜灵杀菌剂有密切关系。本研究揭示的瓜类疫霉在华南地区对甲霜灵抗药性的发生为国内外首次报道。

苯基酰胺类杀菌剂作用位点单一,病菌易对其产生抗药性。左豫虎^[27]、高智谋^[28]、陈方新^[29]等在室内分别通过对大豆疫霉、苕麻疫霉及棉铃疫霉甲霜灵的诱变筛选,获得 M_i^r 突变体,经敏感性测定, M_i^r 突变体对甲霜灵的抗性分别高达其敏感型亲本的 870、1800、及 5000 倍以上。本研究在较短时间内对 5 株 SS 进行抗甲霜灵诱变,有 60% 的菌株诱变成功,部分抗甲霜灵突变体的抗性指数达到其亲本的 407 倍,表明瓜类疫霉在连续接触甲霜灵的条件下极易产生抗药性。

本研究结果表明,在广西、广东两省(区)的主要瓜类产区的瓜类疫霉已普遍对甲霜灵产生了抗性。为此作者建议相关瓜类产区暂停使用甲霜灵等苯基酰胺类内吸性杀菌剂,以消除药剂选择压,最大限度地阻止病菌抗药性发展蔓延,可采用烯酰吗啉、霜脲氰、霜霉威等与甲霜灵无交互抗性^[15-16]的药剂进行瓜类疫病防治;在没有发现有 RS 群体的地区应尽可能减少甲霜灵使用频率及使用量,避免长期单一施用苯基酰胺类内吸杀菌剂,并尽可能与其它作用机理不同的杀菌剂交替使用,从而避免或延缓 RS 群体的形成和发展。另外,应注重综合防治,创造有利于瓜类生长发育而不利于病害发生的环境条件,通过田园清洁、合理轮作、培育壮苗、避雨栽培、合理施肥、科学用水等综合措施进行病害防治^[6]。

致谢 在广东省进行病害样品采集期间,承蒙华南农业大学资源环境学院周而勋教授提供实验条件并给予指导;广西化工研究院方峰工程师提供甲霜灵原药,特此感谢。

参考文献

- [1] 郑小波. 疫霉菌及其研究方法. 北京: 中国农业出版社, 1997.
- [2] 李卫民, 晏卫红, 黄思良, 陆少峰, 陈景成, 岑贞陆, 付岗. 广西黑皮冬瓜疫病的病原菌鉴定及其生物学特性. 植物病理学报 (*Acta Phytopathologica Sinica*), 2007, 37(3): 333-336.
- [3] 黄建坤, 戚佩坤. 广州地区黄瓜疫病病原菌的鉴定及防治研究. 华南农学院学报 (*Journal of South China Agricultural College*), 1982, 3(2): 36-45.
- [4] 陆家云, 龚龙英. 南京地区黄瓜疫病病原菌的鉴定及生物学特性的研究. 南京农学院学报 (*Journal of Nanjing Agricultural College*), 1982, (3): 28-38.
- [5] 朱豪红, 陈景成, 吴永官, 党绍东, 卢继英, 岑佩琴. 玉林市黑皮冬瓜疫病发生影响因素分析及防治技术措施. 中国植保导刊 (*China Plant Protection*), 2009, 29(4): 22-23.
- [6] 陆少峰, 吴永官, 黄思良, 李立志. 冬瓜疫病防治研究进展. 中国农学通报 (*Chinese Agricultural Science Bulletin*), 2007, 23(11): 301-304.
- [7] Davidse LC, Hofman AE, Velthuis GCM. Specific interference of metalaxyl with endogenous RNA polymerase activity in isolated nuclei from *Phytophthora megasperma* f. sp. *medicaginis*. *Experimental Mycology*, 1983, 7: 344-361.
- [8] Gisi U, Cohen Y. Resistance to phenylamide fungicides: a case study with *Phytophthora infestans* involving mating type and race structure. *Annual Review of Phytopathology*, 1996, 34: 549-572.
- [9] Daayf F, Platt HW. Assessment of mating types and resistance to metalaxyl of Canadian populations of *Phytophthora infestans* in 1997. *American Journal of Potato Research*, 1999, 76: 287-295.
- [10] Parra G, Ristaino JB. Resistance to mefenoxam and metalaxyl among field isolates of *Phytophthora capsici* causing *Phytophthora* blight of bell pepper. *Plant Disease*, 2001, 85: 1069-1075.
- [11] Silvar C, Merino F, Díaz J. Diversity of *Phytophthora capsici* in Northwest Spain: Analysis of virulence, metalaxyl response, and molecular characterization. *Plant Disease*, 2006, 90: 1135-1142.
- [12] Ghimire SR, Hyde KD, Hodgkiss IJ, Liew ECY. Phenotypes of *Phytophthora infestans* in Nepal: mating types and metalaxyl sensitivity. *Potato Research*, 2001, 44: 337-347.
- [13] Shattock RC. Studies on the inheritance of resistance to metalaxyl in *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology*, 1988, 37: 4-11.
- [14] Shew HD. Response of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* isolates to metalaxyl exposure. *Plant Disease*, 1985, 69: 559-562.
- [15] 戚仁德, 丁建成, 高智谋, 倪春耕, 蒋婧婧, 李萍. 安徽省辣椒疫霉对甲霜灵的抗药性监测. 植物保护学报 (*Acta Phytophylacica Sinica*) 2008, 35(6): 245-250.
- [16] 朱桂宁, 黄福新, 冯兰香, 秦碧霞, 杨宇红, 陈永惠, 陆秀红. 番茄晚疫病病原菌对甲霜灵、霜脲氰和烯酰吗啉的敏感性检测. 中国农业科学 (*Scientia Agricultura Sinica*) 2008, 41(5): 1355-1365.
- [17] 祝明亮, 白江兰, 李梅云, 李克勤. 烟草黑胫病菌对甲霜灵的抗药性风险. 农药 (*Agrochemicals*) 2007, 46(10): 709-712.
- [18] 杨宇红, 冯兰香, 谢丙炎, 冯东昕. 番茄晚疫病病原菌对甲霜灵的抗性. 植物保护学报 (*Acta Phytophylacica Sinica*) 2003, 30(1): 57-62.
- [19] 曹继芬, 孙道旺, 杨明英, 赵志坚. 云南番茄致病疫霉的交配型、甲霜灵敏感性及毒力类型. 菌物学报 (*Mycosystema*), 2006, 25(3): 488-495.
- [20] 陆少峰, 吴永官, 黄思良, 付岗, 岑贞陆, 覃丽萍. 19种杀菌剂对黑皮冬瓜疫病病原菌室内毒力测定. 广西农业科学 (*Guangxi Agricultural Sciences*), 2007, 38(5): 527-529.
- [21] 吴永官, 黄思良, 陈振东, 陆少峰, 付岗, 岑贞陆. 12种杀菌剂防治黑皮冬瓜疫病的药效试验. // 彭友良, 王振中. 中国植物病理学会2008年学术年会论文集. 广州: 华南农业大学出版社, 2008.
- [22] Schwinn, FJ, Sozzr, D. Recommended methods for detection and measurement of resistance of plant pathogens to fungicides: Method for fungicide resistance in late blight of potato. *FAO Plant Protection Bulletin*, 1982, 30: 69-71.
- [23] 韩秀英, 冯志强, 李红霞, 王文桥, 康丽娟, 张小风. 黄瓜霜霉病菌对啞菌酯的敏感基线研究. 农药学报 (*Chinese Journal of Pesticide Science*), 2004, 6(2): 76-79.
- [24] 陈方新, 高智谋, 齐永霞, 吴红星, 吴向辉. 棉铃疫病病原菌对甲霜灵的抗药性风险研究. 植物保护 (*Plant Protection*) 2004, 30(5): 44-47.
- [25] Lazarovits G, Ward E WB. Relationship between localized glyceollin accumulation and metalaxyl treatment in the control of phytophthora rot in soybean hypocotyls. *Phytopathology*, 1982, 72(9): 1217-1221.
- [26] Barak E, Edgington LV, Ripley BD. Bioactivity of the fungicide metalaxyl in potato tubers against some species of *Phytophthora*, *Fusarium*, and *Alternaria*, related to polyphenoloxidase activity. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 1984, 6: 304-308.
- [27] 左豫虎, 侯巨梅, 康振生, 陈长卿, 黄丽丽. 大豆疫霉菌抗甲霜灵特性研究. 菌物学报 (*Mycosystema*) 2005, 24(3): 422-428.
- [28] 高智谋, 郑小波, 陆家云. 苕麻疫霉对甲霜灵抗性遗传研究. 南京农业大学学报 (*Journal of Nanjing Agricultural University*), 1997, 20(3): 54-59.

[29] 陈方新,高智谋,齐永霞,吴红星,吴向辉. 棉铃疫病菌 (*Phytophthora boehmeriae*) 对甲霜灵的抗性遗传研究.

植物病理学报 (*Acta Phytopathologica Sinica*), 2004, 34(4): 296-301.

Field resistance of *Phytophthora melonis* to metalaxyl in South China

Yongguan Wu^{1 2}, Shaofeng Lu², Siliang Huang^{3*}, Gang Fu², Liang Chen⁴, Dasen Xie⁵, Qiqin Li¹, Zhenlu Cen²

¹ College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530005, China

² Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China

³ College of Life Sciences and Technology, Nanyang Normal University, Nanyang 473061, China

⁴ College of Agriculture, Yangtze University, Jingzhou 434025, China

⁵ Vegetable Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China

Abstract [Objective] *Phytophthora melonis* is the casual agent of wax gourd and cucumber *Phytophthora* blight which becomes a constraint for sustainable production of the related crops. Metalaxyl is one of the principal fungicides for controlling the disease now. The objectives of the present study were: (1) to investigate the baseline sensitivity and field resistance of *P. melonis* to metalaxyl in South China; (2) to test the occurrence of metalaxyl-resistant mutants from metalaxyl-sensitive wild type strains exposed to the fungicide; and (3) to monitor the development of metalaxyl resistance in *P. melonis* population. **[Methods]** Over 400 samples of wax gourd and cucumber *Phytophthora* blight were collected from Guangxi Zhuang Autonomous Region and Guangdong province during 2007–2010, and 193 strains of *P. melonis* were isolated and purified. The sensitivity of the isolated strains to metalaxyl was tested using mycelial growth rate method *in vitro* and floating-leaf-disk method *in vivo*, respectively. The metalaxyl-sensitive strains were induced on PDA plates containing 10 µg/mL metalaxyl. **[Results]** The sensitive, moderately resistant and resistant strains were recorded as 29.0%, 18.1% and 52.8%, respectively, among 193 tested strains. The frequency and level of resistance of *P. melonis* from Guangdong were higher than that from Guangxi. The strains from cucumber was generally more resistant to metalaxyl than those from wax gourd. The metalaxyl-resistant strains were frequently detected as predominant populations in most of the sampling sites and the highest resistance index (4226.9) was confirmed. Metalaxyl-resistant (M_1^r) mutants could be isolated from approximately 60% of the sensitive wild-type strains. The resistance level of the M_1^r mutants was 189–407 times higher than that of their sensitive parental strains. The EC_{50} values of 9 sensitive strains from a sampling site without a record of phenylamide fungicide application ranged from 0.0429 to 0.5461 µg/mL. Their mean EC_{50} value (0.3200 ± 0.1617 µg/mL) was considered as the baseline sensitivity of *P. melonis* to metalaxyl in South China. **[Conclusion]** Metalaxyl-resistant strains universally occur in South China, especially in the vegetable-growing areas with a longer history of metalaxyl application. The establishment of the baseline sensitivity of *P. melonis* to metalaxyl will provide a science-based guide for evaluating and further monitoring resistance of the pathogen to the fungicide.

Keywords: *Phytophthora melonis*, metalaxyl, fungicide resistance, baseline sensitivity, test

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Grants from Guangxi Academy of Agricultural Sciences (200916, 201017) and by the Grant from the Finance Department of Guangxi Zhuang Autonomous Region (Gui-Cai-Yu-Han-2008–119)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-377-63513641; E-mail: silianghuang@126.com

Received: 25 January 2011 / Revised: 11 April 2011