

福建省致病疫霉交配型分布 及对甲霜灵的抗药性

陈庆河 翁启勇* 谢世勇 兰成忠 卢 同

(福建省农业科学院植物保护研究所,福州 350013)

摘要: 为明确福建省致病疫霉 *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary 交配型分布及对甲霜灵的抗性情况,对1999~2002年分离的致病疫霉进行了交配型和抗药性水平测定。发现福建省同时存在致病疫霉的 A1、A2 两种交配型菌株,被测定的 89 个菌株中,73 个菌株为 A1 交配型,16 个为 A2 交配型,分别占 82.1% 和 17.9%;对甲霜灵抗药性测定表明,高抗、中抗和敏感菌株分别占 36.0%、48.3%、15.7%,不同菌株对甲霜灵的敏感程度差异很大;离体测定对甲霜灵的敏感性表明,1.0 $\mu\text{g/mL}$ 甲霜灵对敏感菌株的平均防治效果为 68.7%,而 500 $\mu\text{g/mL}$ 浓度对高抗菌株的防治效果仅为 69.7%,说明致病疫霉对甲霜灵产生高抗药性。

关键词: 致病疫霉; A2 交配型; 卵孢子; 甲霜灵; 抗药性

由致病疫霉 *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary 引起的晚疫病是马铃薯和番茄生产上一种重要病害,在我国各地均有发生。据报道近年来晚疫病在世界各地的再度严重流行与致病疫霉 A2 交配型的产生和迁移有关^[1]。首先,有性生殖的产生增加了具厚壁卵孢子这一初侵染源,同时 A2 交配型的存在使有性重组的机会增加,可加速病菌小种的变异,而其致病力、寄生适合度也提高^[2]。因此,研究致病疫霉交配型的分布在理论和实践上均具有重要意义。1956 年 Niederhauser 首次证实了在墨西哥存在 A2 交配型^[3],1984 年又报道了在瑞士发现 A2 交配型之后,引起各国植物病理学家的重视^[4]。因此,很多国家的植病学者纷纷在本国展开调查研究。目前,世界上许多国家都已发现了 A2 交配型菌株^[5],1996 年我国张志铭等^[6]首次报道了内蒙、山西存在 A2 交配型,河北、云南、四川等省份也相继发现 A2 交配型^[5,7],但尚未见报道福建省是否存在致病疫霉 A2 交配型。

甲霜灵 (metalaxyl) 作为一种防治卵菌纲真菌病害有特效的内吸性杀菌剂,其作用位点单一,长期使用极易使病原菌产生抗药性,自 20 世纪 70 年代末投入生产用于防治病害以来,许多国家报道已产生高抗药性^[8],导致防治效果降低,甚至完全失效。我国也已有致病疫霉对甲霜灵产生抗药性的报道^[9]。随着甲霜灵的大面积使用,及时检测致病疫霉

基金项目:福建省自然科学基金(B0210031)、福建省科技厅重大项目(2000Z006)及福建省农业厅项目(200102)资助

作者简介:陈庆河(1971-),男,副研究员,从事植物病原真菌学研究(E-mail: chenqh11@yahoo.com.cn)

* 通讯作者(E-mail: zjwengqy@pub5.fz.fj.cn); 收稿日期:2003-06-28

对甲霜灵的抗性水平对指导晚疫病防治具有重要的意义。福建省致病疫霉对甲霜灵的敏感性尚无研究报道,为此,作者进行了致病疫霉交配型分布及对甲霜灵抗药性研究,为明确近年来晚疫病大流行原因及延缓对甲霜灵的抗性提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株:1999~2002年先后从福建省德化、周宁、三明、龙岩、莆田、泉州、漳州、漳平、福州、长乐、永泰、厦门等地马铃薯、番茄上采集具典型晚疫病标本,从中分离、纯化获得致病疫霉菌株89个,分离纯化用选择性培养基,其配方和配制方法参见郑小波^[10]的方法。菌株来源、寄主、采集时间见表1。标准交配型菌株由美国康乃尔大学的 Willam E. F. 博士提供(福建农林大学王宗华研究员转赠)。

1.1.2 供试药剂:97.3%甲霜灵原药(沈阳化工研究院提供),原药先用少量丙酮溶解,然后配成浓度为10 mg/mL的母液。

1.1.3 供试培养基:黑麦琼脂培养基(RA),其配方和配制方法参见郑小波^[10]的方法。

1.1.4 供试植物:马铃薯品种“克新4号”,种植于花盆中,待植株长至6~7片复叶时取其展开叶片,用打孔器打成直径为14 mm的叶盘供试。

1.2 方法

1.2.1 交配型测定:交配型测定参照郑小波^[10]的方法。本试验对分离的89个菌株进行了交配型测定,试验重复2次。同时用标准交配型菌株配对培养作对照。

1.2.2 致病疫霉对甲霜灵抗药性测定:①致病疫霉对甲霜灵的抗药性:采用菌落生长速率法,菌块接种在含甲霜灵0、5、100 $\mu\text{g/mL}$ 的培养基上,18℃下培养14天后采用垂直十字交叉法测量菌落直径,每浓度处理4皿,试验重复2次。抗性测定标准参照 Oyarzun^[11]的方法,在含药5 $\mu\text{g/mL}$ 和100 $\mu\text{g/mL}$ 平板上菌落生长量 $\geq 40\%$ 对照生长量为高抗; $\leq 40\%$ 对照生长量为敏感;而在含药5 $\mu\text{g/mL}$ 的菌落生长量 $> 40\%$ 对照生长量 $>$ 含药100 $\mu\text{g/mL}$ 的菌落生长量为中抗。②致病疫霉对甲霜灵抗性水平:随机选取20个高抗菌株分别移到含甲霜灵浓度为0、10、50、100、250、500、1000 $\mu\text{g/mL}$ 的平板上培养,10个敏感菌株分别移到含甲霜灵浓度为0、0.1、0.5、1、2.5、5、10 $\mu\text{g/mL}$ 的平板上培养,而20个中抗菌株分别移到含甲霜灵浓度为0、1、5、10、25、50、100 $\mu\text{g/mL}$ 的平板上培养,每浓度处理4皿,重复2次。根据甲霜灵对菌丝生长抑制百分率和甲霜灵浓度对数值,作出抑制率回归方程,分别求出 EC_{50} ,以抗性菌株与敏感菌株的 EC_{50} 值之比表示抗性水平。③活体检测致病疫霉对甲霜灵的敏感性:分别随机选取10个敏感、20个中抗、20个高抗的菌株,采用叶盘法进行活体测定^[12]。接种液的制备参见郑小波^[10]的方法,孢子囊浓度调节至 1×10^5 个/mL。在每个培养皿中加入20 mL浓度分别为0、1、10、100、500 $\mu\text{g/mL}$ 的甲霜灵悬浮液,对照用灭菌去离子水,将直径为14 mm叶盘背面朝上置于悬浮液中,每皿10个叶盘,浸泡2 h后,每个叶盘中央滴1滴约20 μL 的接种液,置16℃、12 h光照/12 h黑暗条件下培养5天,按 Deahl^[13]分级标准调查病情,试验重复2次。

2 结果与分析

2.1 交配型分布及发生频率

交配型测定结果表明,被测定的 89 个菌株中,73 个菌株为 A1 交配型,占被测总菌株的 82.1%,16 个菌株为 A2 交配型,占 17.9%,发现同一地区同时存在 A1、A2 交配型。A2 交配型菌株在不同地区的发生频率不同,范围在 12.5% ~ 33.3% 之间(表 1)。前人的研究发现马铃薯晚疫病菌存在同宗配合菌株,单独培养能产生卵孢子^[5],但本研究中所分离的菌株中未发现同宗配合菌株。

表 1 福建省致病疫霉的菌株来源、交配型分布及发生频率

Table 1 Origin, distribution and occurrence frequency of mating type of *Phytophthora infestans* in Fujian

采集地点 Locality	寄主 Host	采集年份 Year of collection	总菌株数 Number of isolates	交配型 Mating type		A2 交配型 发生频率(%) Frequency of A2 mating type
				A1	A2	
德化雷锋镇 Leifeng Dehua	马铃薯 Potato	2001,2002	12	9	3	25.0
周宁县城郊 Zhouning	马铃薯 Potato	2001,2002	13	11	2	15.3
三明将乐县 Jiangle Sanming	马铃薯 Potato	2001	4	4	0	0.0
龙岩农科所 Longyan	马铃薯 Potato	2001	3	3	0	0.0
莆田县农场 Putian	番茄 Tomato	2001	3	3	0	0.0
泉州鲤城区 Quanzhou	番茄 Tomato	2001	5	5	0	0.0
龙海浮宫镇 Fugong Longhai	马铃薯, 番茄 Potato, tomato	2000,2001,2002	8	7	1	12.5
漳平永福镇 Yongfu Zhangping	马铃薯, 番茄 Potato, tomato	1999,2000,2001	5	5	0	0.0
福州近郊 Fuzhou	马铃薯, 番茄 Potato, tomato	1999,2000,2001	18	12	6	33.3
长乐玉田 Yutian Changle	马铃薯, 番茄 Potato, tomato	2001	4	3	1	25.0
永泰崇口 Chongkou Yongtai	马铃薯 Potato	2001,2002	11	8	3	27.2
厦门同安 Tong'an Xiamen	番茄 Tomato	2001	3	3	0	0.0
总计 Total			89	73	16	17.9

2.2 致病疫霉及其有性后代的形态

致病疫霉单株培养生长缓慢,孢囊梗常复合分枝,产生大量圆形至椭圆形孢子囊,具半乳突,易脱落(图 1-A,B);不同交配型菌株配对培养 2~3 周后产生卵孢子(图 1-C,D)。藏卵器球形或近球形,大小为 $28.5 \sim 38.2 \mu\text{m} \times 31.5 \sim 39.1 \mu\text{m}$;雄器着生在藏卵器基部,无色,大小为 $18.5 \sim 23.2 \mu\text{m} \times 10.5 \sim 16.1 \mu\text{m}$;卵孢子球形或近球形,大小为 $37.3 \sim 51.6 \mu\text{m} \times 39.8 \sim 49.1 \mu\text{m}$,同时还发现不同交配型菌株配对产生卵孢子的数量有较大差异,这与前人研究结果一致^[5,7]。

2.3 致病疫霉对甲霜灵抗药性

2.3.1 不同抗性菌株的分布

测定了 89 个菌株对甲霜灵的抗性,结果表明,所采集的福建省各地区致病疫霉均对

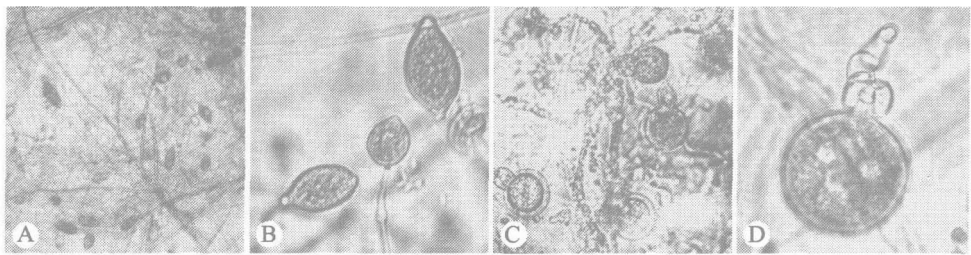


图 1 致病疫霉及其有性后代的形态特征

Fig. 1 The morphological characters of *Phytophthora infestans* and its sexual progeny

注: A. 复合分枝的孢囊梗及孢子囊; B. 孢子囊; C. 交配后产生大量卵孢子; D. 穿雄生藏卵器的卵孢子。Note: A. Sporangiophore and sporangia; B. Sporangia; C. Oospore formed after mating; D. Oospore of oogonium with amphigynous antheridium.

甲霜灵产生抗药性,中抗菌株占优势群体比例达 48.3%,高抗菌株占 36.0%,而敏感菌株只占 15.7%。且各地致病疫霉对甲霜灵敏感性、抗性分布并不一致,福建省漳平、周宁、德化、福州郊区、龙岩等地的致病疫霉均对甲霜灵产生高抗药性,比例达 33.3%~80%,抗性菌株在整个病菌群体中占优势群体,而有些地区尚未分离到高抗菌株(表 2),表明在不同的生态环境和施药水平下致病疫霉对甲霜灵抗性发展的速度也不同。

表 2 致病疫霉对甲霜灵敏感性及抗性程度分布

Table 2 Sensitivity and resistant distribution of *P. infestans* to metalaxyl

采集地点 Locality	菌株数 No. of isolates	敏感 Sensitive		中抗 Intermediate		高抗 Resistance	
		株数	百分率(%)	株数	百分率(%)	株数	百分率(%)
		Number	Frequency	Number	Frequency	Number	Frequency
德化 Dehua	12	0	0.0	8	66.7	4	33.3
周宁 Zhouning	13	1	7.7	2	15.4	10	76.9
三明 Sanming	4	3	75.0	1	25.0	0	0.0
龙岩 Longyan	3	1	33.3	1	33.3	1	33.3
莆田 Putian	3	0	0.0	2	66.7	1	33.3
泉州 Quanzhou	5	2	40.0	3	60.0	0	0.0
漳州 Zhangzhou	8	0	0.0	8	100.0	0	0.0
漳平 Zhangping	5	0	0.0	1	20.0	4	80.0
福州近郊 Fuzhou	18	3	16.7	7	38.9	8	44.4
长乐 Changle	4	1	25.0	3	75.0	0	0.0
永泰 Yongtai	11	2	18.2	5	45.5	4	36.3
厦门 Xiamen	3	1	33.3	2	66.7	0	0.0
总计 Total	89	14	15.7	43	48.3	32	36.0

2.3.2 致病疫霉对甲霜灵的抗性水平

菌落直径法测定对甲霜灵抗性,结果表明,随机选取的 10 个敏感菌株中,甲霜灵对各菌株的生长抑制 EC_{50} 为 0.132~1.130 $\mu\text{g/mL}$,平均为 0.628 $\mu\text{g/mL}$;对 20 个中抗菌株的 EC_{50} 为 6.468~117.563 $\mu\text{g/mL}$,平均为 57.668 $\mu\text{g/mL}$;而对 20 个高抗菌株的 EC_{50} 为

186.574 ~ 465.103 $\mu\text{g/mL}$, 平均为 327.563 $\mu\text{g/mL}$ (表 3)。表明不同抗性菌株对甲霜灵的敏感程度差异很大。

2.3.3 活体检测致病疫霉对甲霜灵的敏感性

叶盘漂浮法测定对甲霜灵的敏感性,结果(表 3)表明,1.0 $\mu\text{g/mL}$ 甲霜灵浓度对敏感菌株接种的平均防治效果为 68.7%,而 500 $\mu\text{g/mL}$ 甲霜灵对高抗菌株的防治效果也仅 69.7%,说明对于高抗菌株,在生产上即使提高用药浓度,也无法得到有效防治,且发现 500 $\mu\text{g/mL}$ 甲霜灵对马铃薯叶片有药害现象。

表 3 致病疫霉对甲霜灵的抗药性

Table 3 Resistance of *P. infestans* to metalaxyl

菌株类型 Type of isolates	测定菌株数 No. of test	抑制有效 中浓度 EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	抗药水平 Resistance level	不同浓度甲霜灵对晚疫病的平均防治效果(%) Average effect of metalaxyl to control late blight				
				0 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	500 $\mu\text{g/mL}$
敏感菌株 Sensitive	10	0.628	—	—	68.7	97.6	100.0	100.0
中抗菌株 Intermediate	20	57.668	91.8	—	11.4	37.6	83.2	98.9
高抗菌株 Resistant	20	327.563	521.6	—	5.7	17.9	45.5	69.7

3 结论与讨论

杨宇红等^[12]研究了我国 16 省市番茄晚疫病菌对甲霜灵的抗性,表明福建省是全国晚疫病菌抗性最严重的地区。本研究抗药性测定结果也表明,福建省许多地区的致病疫霉均对甲霜灵产生高抗药性。抗性群体的产生可能与近年来福建省晚疫病大流行有关。究其原因可能有两点:一是由于近年来晚疫病发生严重,使得田间防治晚疫病的甲霜灵用药量加大、施药次数增加而产生药剂的选择压力,从而加快抗药性群体的发展;再者,由于致病疫霉对甲霜灵的抗性是由细胞核单个显性基因控制,其抗性性状在无性繁殖后代通常可以稳定遗传,单剂连续使用极易产生抗药性突变而产生抗药性群体。

但是,甲霜灵仍是一个防治晚疫病特效的杀菌剂,施用甲霜灵混剂仍是目前防治晚疫病有效的策略,它在防治晚疫病中一直占有重要位置。建议今后在防治晚疫病时采用与保护性杀菌剂复配(或混配)使用;单剂只限于土壤施用和种子处理,且每季作物要限制使用次数;同时,采用其它药剂与甲霜灵交替使用防治病害。

致谢:承蒙亚洲蔬菜研究中心王添成研究员与中国农科院蔬菜研究所冯兰香研究员提供试验材料并给予指导;福建农林大学王宗华研究员转赠标准交配型菌株,沈阳化工研究院李志念先生提供甲霜灵原药,特此感谢。

参 考 文 献(References)

1 Fry W E, Goodwin S B. Re-emergence of potato and tomato late blight in the United States. *Plant Disease*, 1997, 81(12): 1349 - 1357

2 Tooley P W, Sweigard J A, Fry W E. Fitness and virulence of *Phytophthora infestans* isolates from sexual and asexual populations. *Phytopathology*, 1986, 76(11):1209 - 1212

- 3 Niederhauser J S. The blight, the blighter, and the blighted. Trans. New York Acad. Sci. ,1956,19: 55 – 63
- 4 Hohl J G, Iselin K. Strains of *Phytophthora infestans* from Switzerland with A2 mating type behaviour. Trans. Br. Mycol. Soc. ,1984, 83(3) :529 – 530
- 5 赵志坚,王淑芬,李成云,等. 云南省发现马铃薯晚疫病病菌交配型分布及发生频率. 西南农业学报,2001,14(4) :55 – 57
- 6 Zhang Z M, Li Y Q, Tian S M, *et al.* The occurrence of potato late blight pathogen (*Phytophthora infestans*) A2 mating type in China. J. Agric. Univ. Hebei, 1996, 19(4) :62 – 65
- 7 朱杰华,张志铭,李玉琴. 马铃薯晚疫病病菌 A2 交配型的分布. 植物病理学报,2000,30(4) :375
- 8 Goodwin S B, Sujkowski L S, Fry W E. Widespread distribution and probable origin of resistance to metalaxyl in clonal genotypes of *Phytophthora infestans* in the United States and Western Canada. Phytopathology, 1996, 86:793 – 800
- 9 杨宇红,冯兰香,谢丙炎,等. 番茄晚疫病病菌对甲霜灵的抗性. 植物保护学报,2003,30(1) :57 – 62
- 10 郑小波. 疫霉菌及其研究技术. 北京:中国农业出版社,1997
- 11 Oyarzun P J, Pozo A, Ordonez M E, *et al.* Host specificity of *Phytophthora infestans* on tomato and potato in Ecuador. Phytopathology, 1998, 88(3) :265 – 271
- 12 Fry W E, Drenth A, Goodwin S B, *et al.* Historical and recent migration of *Phytophthora infestans*: chronology, pathways and implication. Plant Disease, 1993, 77(7) :653 – 661
- 13 Dealh K L, Inglas D A, DeMuth S P. Testing for resistance to metalaxyl in *Phytophthora infestans* isolates from northwestern Washington. Am. Potato J. ,1993,70:779 – 795

Distribution of mating type and metalaxyl-resistance of *Phytophthora infestans* in Fujian

CHEN Qing-he WENG Qi-yong XIE Shi-yong LAN Cheng-zhong LU Tong

(Institute of Plant Protection, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China)

Abstract: The distribution of mating type and metalaxyl-resistance of *Phytophthora infestans* isolated during 1999 – 2002 in Fujian were investigated. The results showed that both A1 and A2 mating types existed in Fujian. Amongst 89 isolates tested, 73 were A1 mating type, 16 were A2. The frequency of A1 and A2 were 82.1% , 17.9% , respectively. The test for metalaxyl-resistance indicated that the proportion of resistant, intermediate and sensitive were 36.0%、48.3%、15.7% , respectively. The metalaxyl-resistance of different isolates were markedly different, the systemic protection value of metalaxyl at 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to sensitive isolates was 68.7% , however, that of metalaxyl at 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to resistance isolates was 69.7% . Results strongly indicated that metalaxyl-resistance has seriously developed in *Phytophthora infestans*.

Key words: *Phytophthora infestans*; A2 mating type; oospore; metalaxyl; resistance