

辣椒疫霉对双炔酰菌胺敏感性及其对其它杀菌剂的交互抗性

韩秀英¹ 赵卫松^{1,2} 齐永志¹ 王文桥¹ 马志强¹ 张小凤^{1*}

(1. 河北省农林科学院植物保护研究所, 河北省农业有害生物综合防治工程技术研究中心, 保定 071000; 2. 河北农业大学植物保护学院, 保定 071000)

摘要: 采用菌丝生长速率法测定了不同地区 115 个辣椒疫霉菌株对双炔酰菌胺的敏感性, 同时测定了紫外诱变和药剂驯化的 10 个抗性突变体及其 4 个亲本菌株对双炔酰菌胺、烯酰吗啉、甲霜灵、嘧菌酯和霜脲氰的敏感性。山东青州、寿光和河北定兴、藁城 4 地辣椒疫霉菌株均对双炔酰菌胺较敏感, 且敏感性差异不显著。不同抗性水平菌株对 5 种药剂的敏感性测定和相关性分析结果显示, 双炔酰菌胺与其它几类药剂之间均不存在交互抗性。10 个抗性突变体继代培养 11 代后, 8 个抗性突变体抗药性不能稳定遗传; 2 个抗性突变体抗药性不仅能够稳定遗传, 且 EC_{50} 值维持在很高水平, 分别为 1 429.524 $\mu\text{g/mL}$ 和 6 872.476 $\mu\text{g/mL}$, 因此, 双炔酰菌胺的连续使用有利于抗药群体的发展。

关键词: 辣椒疫霉菌; 双炔酰菌胺; 敏感性; 交互抗性; 遗传稳定性

Sensitivity of *Phytophthora capsici* to mandipropamid and its cross resistance with other fungicides

Han Xiuying¹ Zhao Weisong^{1,2} Qi Yongzhi¹ Wang Wenqiao¹ Ma Zhiqiang¹ Zhang Xiaofeng^{1*}

(1. Institute of Plant Protection, Hebei Academy of Agricultural & Forestry Sciences, IPM Centre of Hebei Province, Baoding 071000, Hebei Province, China; 2. College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei, Baoding 071000, Hebei Province, China)

Abstract: The sensitivities of 115 isolates of *Phytophthora capsici* collected from different regions to mandipropamid were tested by measuring mycelial growth rate. Ten resistant-mutants and 4 sensitive isolates to mandipropamid were used to study its cross resistance with dimethomorph, metalaxyl, azoxystrobin and cymoxanil by comparing their sensitivity to diverse active mechanism fungicides. The results showed that there were no significant differences among the EC_{50} of mandipropamid to isolates from Qingzhou, Shouguang, Dinxing and Gaocheng regions, and all those isolates were more sensitive to mandipropamid. The linear regression showed that there were no cross resistances between mandipropamid and other diverse active mechanism fungicides. After 11 successive incubation, the sensitivities of 2 of 10 resistant-mutants to mandipropamid could maintain their resistance inheritable stability with the EC_{50} of 1 429.524 $\mu\text{g/mL}$ and 6 872.476 $\mu\text{g/mL}$ respectively, but the other 8 could not maintain it. Our results indicated that the continuous use of mandipropamid was beneficial to development of resistance populations.

Key words: *Phytophthora capsici*; mandipropamid; sensitivity; cross resistance; stability of heredity

基金项目: 河北省科技支撑计划(08220302D), 公益性行业(农业)科技专项(200903033)

作者简介: 韩秀英, 女, 1963 年生, 研究员, 研究方向为杀菌剂抗药性及其应用技术, email: xiuying_han@yahoo.com.cn

* 通讯作者(Author for correspondence), email: zbs1103@163.com, Tel: 0312-5915666

收稿日期: 2010-06-02

辣椒疫病是由辣椒疫霉菌 *Phytophthora capsici* 引起的重要病害,在辣椒生长期均可侵染发病,且土壤中病菌数量较大^[1-3]。植株发病初期通常茎基部变褐,最终萎蔫枯死。在一些长期种植辣椒的地区,一般发病田块损失达 20%~30%,严重田块绝产无收^[4]。化学防治是防治辣椒疫病的主要措施,甲霜灵(metalaxyl)是防治该病的常用药剂,但国内外均出现了防治失效的现象^[5-6]。何允波等^[7]、邵见阳和马辉刚^[8]研究表明,吉林省和江西省的大部分辣椒疫霉菌株对甲霜灵存在抗性,最高抗性倍数达 200~500 倍;美国东南部田间也有 81% 的疫霉菌株对甲霜灵表现为中等抗性^[9-11]。随后甲氧基丙烯酸酯类药剂在世界范围内被广泛使用,但是由于其作用位点单一,且作用靶标自发突变频率较高,在高选择压力下,病原菌极易产生抗药性群体^[12]。Ishii 等^[13]在日本检测到黄瓜白粉病菌和霜霉病菌对啞菌酯(azoxystrobin)的抗性菌株。本实验室检测到部分地区的辣椒疫霉菌株对啞菌酯的敏感性有较大差异。崔晓岚等^[14]通过紫外诱导辣椒疫霉菌获得的 13 个抗烯酰吗啉(dimethomorph)突变体中,高抗和大部分中抗突变体均具有较高的生存适合度,有利于抗性群体的发展,对烯酰吗啉具有潜在的抗性风险。因此,寻找高效替代药剂已经成为当务之急。

双炔酰菌胺(mandipropamid)是一种结构新颖的扁桃酸酰胺类化合物,对番茄晚疫病和黄瓜霜霉病以及其它蔬菜作物的卵菌纲病害均具有很好的防治效果^[15]。目前尚未见辣椒疫霉菌对双炔酰菌胺的敏感性及其交互抗性的相关报道。本研究通过检测不同地区辣椒疫霉菌对双炔酰菌胺的敏感性,研究抗性突变体的遗传稳定性及不同药剂之间的交互抗性。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株:辣椒疫霉菌株分别于 2009 和 2010 年采自河北定兴、藁城和山东寿光、青州。将采集的辣椒病株发病茎段用信封装好带回实验室,采用胡萝卜琼脂培养基(CA)进行分离纯化后保存待用。抗性突变体 UVJB-11、UVJB-12、UVJB-17、UVJB-8 和 UVJB-2 是采用紫外和角变相结合的方法^[14, 16-17]对亲本菌株 DXS 3-a 诱导获得;DXS3-C-10m、DXN3-b-20m 和 DX2-3-20m 为采用紫外诱导获得(亲本分别为 DXS3-C、DXN3-b 和 DX2-3);DX2-3-F7 为通过药剂驯化获得的抗性突变体(亲本为 DX2-3)。

供试药剂:95% 双炔酰菌胺(mandipropamid)原药,委托沈阳化工研究院提取;97.6% 烯酰吗啉(dimethomorph)原药,江苏长青农化股份有限公司提供;97% 甲霜灵(metalaxyl)原药,沈阳化工研究院提供;95% 啞菌酯(azoxystrobin)原药,南京金土地化工有限公司提供;98% 霜脲氰(cymoxanil)原药,利民化工有限责任公司提供。

1.2 方法

1.2.1 含药培养基的配制

称取一定量的供试药剂,用丙酮溶解后配制成浓度为 $1.0 \times 10^4 \mu\text{g/mL}$ 的母液,并用灭菌的去离子水稀释成 0.005、0.01、0.02、0.03、0.04、0.06 $\mu\text{g/mL}$ 。将熔化的 CA 培养基冷却至 50℃ 左右,用移液枪分别加入上述系列浓度药液,充分摇匀后倒入直径 6 cm 的培养皿中制成所需浓度的含药培养基平板。

1.2.2 辣椒疫霉菌对双炔酰菌胺的敏感性

采用菌丝生长速率法测定。将在 CA 平板上培养 3 天的辣椒疫霉菌株,用灭菌的直径 5 mm 的打孔器沿菌落边缘打取菌块,菌丝面朝下分别接种于含系列浓度药剂的培养基平板上,每处理 3 次重复,并设溶剂对照和空白对照。于 25℃ 下黑暗培养 3 天后,量取菌落生长直径(mm),计算药剂对菌丝生长的抑制率。抑制率(%) = $\{[(\text{对照菌落生长直径} - 5) - (\text{处理菌落生长直径} - 5)] / (\text{对照菌落生长直径} - 5)\} \times 100^{[18]}$ 。

1.2.3 双炔酰菌胺与不同杀菌剂之间的交互抗性

按照 1.2.2 的方法测定 10 个抗性突变体及其亲本菌株对双炔酰菌胺、烯酰吗啉、甲霜灵、啞菌酯和霜脲氰的敏感性。

1.2.4 抗性菌株的遗传稳定性测定

将供试抗性菌株及其亲本菌株,分别转接到空白的 CA 培养基平板上,继代培养 11 代,按照 1.2.2 的方法分别测定 1、3、5、7、9、11 代对双炔酰菌胺的敏感性。

1.3 数据统计分析

采用 DPS 软件 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性分析,并求出毒力回归方程 $Y = bx + a$ 以及药剂的有效抑制中浓度 EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) 和相关系数。

2 结果与分析

2.1 辣椒疫霉菌对双炔酰菌胺的敏感性

山东青州、寿光两地区的病原菌对双炔酰菌胺

的敏感性无显著差异,EC₅₀平均值均小于 0.020 μg/mL,其中,青州最敏感菌株的 EC₅₀ 值为 0.003 μg/mL;在寿光菌株中有 2 个菌株的 EC₅₀ 值大于 0.020 μg/mL,但其 EC₅₀ 平均值为 0.012 μg/mL。采集于

河北定兴、藁城的菌株对双炔酰菌胺的敏感性也不存在显著性差异,最不敏感菌株的 EC₅₀ 值仅为 0.050 μg/mL。河北与山东两地区菌株之间无显著性差异(表 1)。

表 1 115 个辣椒疫霉菌株对双炔酰菌胺的敏感性

Table 1 The sensitivity of 115 isolates of *Phytophthora capsici* to mandipropamid

地点 Location	菌株数量 Number of strain	频率(%) Frequency	EC ₅₀ 值 EC ₅₀ value (μg/mL)	
			范围 Range	Mean ± SE
定兴 Dingxing	35	30.43	0.015 ~ 0.050	0.029 ± 0.008 a
藁城 Gaocheng	15	13.04	0.016 ~ 0.028	0.021 ± 0.004 a
青州 Qingzhou	40	34.78	0.003 ~ 0.019	0.012 ± 0.004 a
寿光 Shouguang	25	21.74	0.005 ~ 0.024	0.012 ± 0.005 a

注:数据后相同字母表示差异不显著($P=0.05$) (Duncan 氏新复极差法)。Note: Data followed by the same letters are not significantly different by Duncan's new multiple range test ($P=0.05$).

2.2 双炔酰菌胺与不同杀菌剂之间的交互抗性

结果显示,双炔酰菌胺与其它 4 种供试药剂的相关系数分别为 0.3199、0.0191、0.0519、0.2252。 F 检验的显著水平 P 分别为 0.0529、0.6672、0.4748 和 0.1162,均未达显著水平,故双炔酰菌胺与烯酰吗啉、啉菌酯、甲霜灵和霜脲氰之间均不存在交互抗性(图 1)。

2.3 抗性菌株遗传稳定性

药剂驯化的抗性突变体 DX2-3-F7 继代培养 11 代后 EC₅₀ 值仍很高,为 6 872.476 μg/mL。在紫外诱导的 9 个抗性突变体中,有 8 个抗性突变体随着继代培养代数的增加,其抗性水平下降或丧失,而突变体 DX2-3-20m 继代培养 11 代后 EC₅₀ 值仍高达 1 429.524 μg/mL(表 2)。

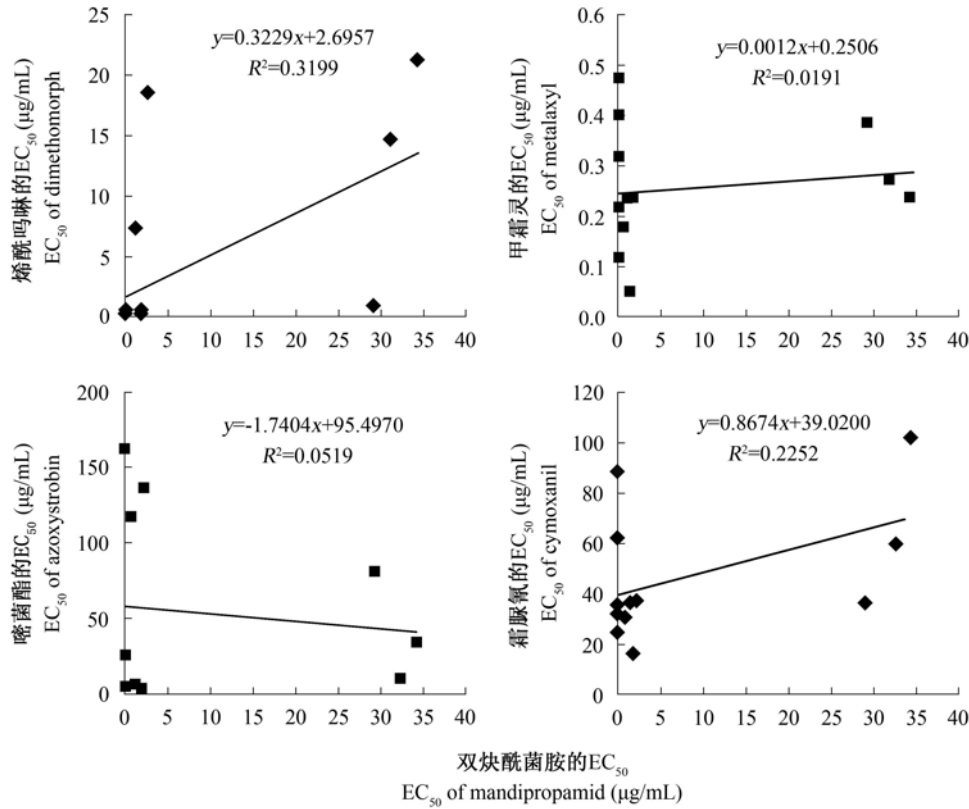


图 1 双炔酰菌胺与不同杀菌剂的交互抗性

Fig. 1 Cross-resistance between mandipropamid and others fungicides

表 2 抗性菌株对双炔酰菌胺的遗传稳定性

Table 2 Resistance hereditary stability of resistant isolates to mandipropamid

菌株 Isolate	EC ₅₀ (mean ± SE) (μg/mL)					
	第 1 代	第 3 代	第 5 代	第 7 代	第 9 代	第 11 代
	First generation	Third generation	Fifth generation	Seventh generation	Ninth generation	Eleventh generation
DXS3-a	0.022 ±	0.020 ±	0.021 ±	0.020 ±	0.021 ±	0.027 ±
	0.009 a	0.009 a	0.013 a	0.011 a	0.011 a	0.011 a
UVJB-11	1.966 ±	1.576 ±	0.114 ±	0.052 ±	0.132 ±	0.008 ±
	0.557 a	0.074 a	0.042 b	0.002 c	0.024 b	0.001 d
UVJB-12	1.674 ±	1.466 ±	1.265 ±	0.953 ±	0.887 ±	0.443 ±
	0.741 a	0.555 a	0.459 a	0.455 ab	0.380 ab	0.125 b
UVJB-17	0.867 ±	0.840 ±	0.853 ±	0.799 ±	0.874 ±	0.146 ±
	0.421 a	0.325 a	0.421 a	0.197 a	0.656 a	0.050 b
UVJB-8	1.305 ±	1.326 ±	1.133 ±	1.231 ±	0.094 ±	0.051 ±
	0.524 a	0.624 a	0.009 a	0.409 a	0.031 b	0.022 b
UVJB-2	0.142 ±	0.069 ±	0.063 ±	0.078 ±	0.053 ±	0.063 ±
	0.051 a	0.032 a	0.058 a	0.061 a	0.033 a	0.021 a
DXS3-C	0.019 ±	0.019 ±	0.021 ±	0.019 ±	0.021 ±	0.018 ±
	0.002 a	0.005 a	0.010 a	0.006 a	0.011 a	0.008 a
DXS3-C-10m	32.335 ±	33.347 ±	29.840 ±	0.263 ±	0.065 ±	0.043 ±
	12.215 a	13.699 a	22.598 a	0.174 b	0.022 c	0.012 c
DX2-3	0.018 ±	0.017 ±	0.017 ±	0.018 ±	0.018 ±	0.017 ±
	0.004 a	0.008 a	0.001 a	0.005 a	0.005 a	0.007 a
DX2-3-20m	6988.733 ±	24116.063 ±	1750.277 ±	2130.660 ±	1683.741 ±	1429.524 ±
	654.359 b	687.987 a	666.196 c	189.255 c	253.125 c	345.288 c
DX2-3-30m	0.114 ±	0.033 ±	0.064 ±	0.044 ±	0.054 ±	0.043 ±
	0.051 a	0.004 a	0.055 a	0.034 a	0.023 a	0.025 a
DX2-3-F7	34.370 ±	1667.228 ±	66374.658 ±	5830.528 ±	249617.511 ±	6872.476 ±
	11.259 d	135.564 c	2354.255 b	348.251 c	2994.698 a	325.699 c
DXN3-b	0.017 ±	0.017 ±	0.018 ±	0.018 ±	0.017 ±	0.017 ±
	0.002 a	0.007 a	0.009 a	0.006 a	0.008 a	0.007 a
DXN3-b-20m	29.267 ±	16.295 ±	32.761 ±	4.753 ±	0.102 ±	0.009 ±
	12.460 a	5.688 ab	11.852 a	2.357 b	0.052 c	0.004 d

注:同行数据后相同字母表示差异不显著($P=0.05$) (Duncan 氏新复极差法)。Note: Data in the same column followed by the same letters are not significantly different by Duncan's new multiple range test ($P=0.05$).

3 讨论

山东青州、寿光和河北定兴、藁城等 4 地的 115 个辣椒疫霉菌株对双炔酰菌胺的 EC₅₀ 值均处于一个较低的水平,平均值在 0.029 μg/mL 以下,说明可以在这些地区使用双炔酰菌胺进行辣椒疫病的防治。不同地区菌株对双炔酰菌胺的敏感性不同,可能与当地辣椒疫病防治用药史有关,也可能与不同地区的辣椒疫霉菌存在着遗传多样性有关^[19]。

本研究结果表明,双炔酰菌胺与烯酰吗啉、啮菌酯、甲霜灵和霜脲氰之间均不存在交互抗性。因此,在田间有抗药性菌株存在的情况下,双炔酰菌胺可

以与烯酰吗啉、甲霜灵、啮菌酯和霜脲氰及其同类药剂交替或轮换使用。

10 个抗性突变体继代培养 11 代后,其中 8 个不能稳定遗传,2 个抗性突变体抗性倍数仍处于较高水平,说明存在病菌抗药性稳定遗传。田间一旦产生抗性菌株,在有药剂选择压的情况下,抗性菌株很可能上升为优势种群,将给防治带来一定的困难。因此,建议使用双炔酰菌胺防治辣椒疫病时应与多位点保护性杀菌剂(代森锰锌、福美双、百菌清、铜制剂等)混用或轮用,以缓解内吸性杀菌剂对抗药性的选择压力,延长药剂的使用寿命^[20-21]。同时在使用双炔酰菌胺的地区监测辣椒疫霉对其抗药性的

变化动态,根据监测结果及时调整防治策略和用药方法。

钱忠海等^[20]在离体条件下测定了辣椒疫霉菌菌丝生长、游动孢子萌发和游动孢子囊形成和萌发对啞菌酯的敏感性,结果表明辣椒疫霉菌不同发育阶段对药剂的敏感性不同。尹敬芳等^[22]的研究结果也得出相似结论。本研究仅进行了双炔酰菌胺对菌丝生长的毒力测定,显示其较强的抑制作用,但对辣椒疫霉菌其它生长发育阶段的毒力,还有待进一步研究。

参 考 文 献(References)

- [1] 杜晓华,巩振辉,李大伟. 辣椒抗疫病的遗传与育种. 西北农业学报,2005,14(1):30-36
- [2] 蔡艳,薛泉宏,陈占全,等. 青海省保护地辣椒根际土壤和根表放线菌研究. 应用与环境生物学报,2003,9(1):92-96
- [3] 刘永刚,张海英,郭建国,等. 甘肃省辣椒疫霉菌的交配型分布及其致病力差异. 植物保护学报,2008,35(5):448-452
- [4] 郭志祥,何成兴,吴文伟,等. 烯酰吗啉、甲霜灵-锰锌对辣椒疫霉的抑菌活性. 云南大学学报(自然科学版),2008,30(S1):188-189
- [5] 戚仁德,丁建成,高智谋,等. 安徽省辣椒疫霉对甲霜灵的抗药性监测. 植物保护学报,2008,35(3):245-250
- [6] Keinath A P. Sensitivity of populations of *Phytophthora capsici* from South Carolina to mefenoxam, dimethomorph, oxamide, and cymoxanil. Plant Disease, 2007, 91(6):743-748
- [7] 何允波,唐丽萍,张宝国. 辣椒疫病菌的抗药性和新药剂的筛选研究. 吉林农业科学,2004,29(3):26-29,36
- [8] 邵见阳,马辉刚. 辣椒疫霉菌对内吸性杀菌剂抗药性的研究. 江西农业学报,1998,10(4):46-50
- [9] French-Monar R D, Jones J B, Roberts P D. Characterization of *Phytophthora capsici* associated with roots of weeds on Florida vegetable farms. Plant Disease, 2006, 90(3):345-350
- [10] 王文桥,刘国容. 卵菌对内吸杀菌剂的抗药性及对策. 植物病理学报,1996,26(4):294-296
- [11] Matheron M E, Porchas M. Comparison of five fungicides on development of root, crown, and fruit rot of chile pepper and recovery of *Phytophthora capsici* from soil. Plant Disease, 2000, 84(9):1038-1043
- [12] 李红霞,刘照云,王建新,等. 辣椒炭疽病菌对啞菌酯的敏感性测定. 植物病理学报,2005,35(1):73-77
- [13] Ishii H, Fraaije B A, Sugiyama T, et al. Occurrence and molecular characterization of strobilurin resistance in cucumber powdery mildew and downy mildew. Phytopathology, 2001, 91:1166-1171
- [14] 崔晓岚,孟庆晓,毕扬,等. 辣椒疫霉对烯酰吗啉的敏感性基线及室内抗药突变体研究. 植物病理学报,2009,39(6):630-637
- [15] 迟会伟,刁杰,聂开晟,等. 新型杀菌剂双炔酰菌胺. 农药,2007,46(1):52-54
- [16] 戚仁德,丁建成,顾江涛,等. 辣椒疫霉抗甲霜灵菌株的致病力研究. 安徽农业科学,2001,29(2):217-218,222
- [17] 丁建成,戚仁德,倪春耕,等. 辣椒疫霉菌对甲霜灵的抗性风险研究. 中国瓜菜,2008(3):1-4
- [18] 林才华,王开运,顾春波,等. 山东省草莓枯萎病菌对四种三唑类杀菌剂的敏感性检测. 植物保护学报,2009,36(1):55-60
- [19] 孙文秀,张修国. 不同来源辣椒疫霉菌的系统发育分析. 河南农业科学,2009(2):74-76
- [20] 钱忠海,陈长军,王建新,等. 辣椒疫霉(*Phytophthora capsici* Leonian)不同发育阶段对啞菌酯的敏感性研究. 植物病理学报,2006,36(4):322-327
- [21] Fanigliulo A, Sacchetti M. Mandipropamid: new fungicide against *Phytophthora infestans* on tomato. Acta Horticulturae, 2009, 808:355-358
- [22] 尹敬芳,曹锦,李健强,等. 杀菌剂对辣椒疫霉不同形态菌体的毒力差异. 农药学学报,2005,7(3):227-232