

· 研究论文 ·

马铃薯晚疫病菌对甲霜灵和霜脲氰的敏感性检测

袁善奎¹, 赵志华¹, 刘西莉^{1*}, 刘亮², 姜辉²

(1. 中国农业大学 农学与生物技术学院 植物病理学系, 北京 100094;

2. 农业部农药检定所 农药生物技术中心, 北京 100026)

摘要: 2003~2004年从内蒙古和黑龙江省共采集分离了127株马铃薯晚疫病菌 *Phytophthora infestans*, 并在离体条件下测定了这些菌株对甲霜灵和霜脲氰的敏感性。结果表明: 在2003年分离的内蒙菌株、2003年及2004年分离的黑龙江菌株中对甲霜灵敏感(MS)的菌株频率分别为86.2%、13.8%、17.8%; 虽然霜脲氰在这些地区使用近10年, 但病菌群体对该药剂的敏感性没有下降, EC_{50} 值分布于0.10~0.35 $\mu\text{g/mL}$ 之间, 平均 EC_{50} 值为0.20 (± 0.06) $\mu\text{g/mL}$, 不同敏感性的菌株频率呈连续的单峰曲线分布, 未出现敏感性下降的抗药性亚群体, 可作为马铃薯晚疫病菌对霜脲氰抗药性监测的敏感性基线; 此外, 马铃薯晚疫病菌对甲霜灵和霜脲氰之间没有交互抗药性, 霜脲氰对抗甲霜灵和野生敏感菌株具有相同的活性。

关键词: 马铃薯晚疫病菌; 甲霜灵; 霜脲氰; 抗药性; 敏感性基线

中图分类号: S481.4

文献标识码: A

文章编号: 1008-7303(2005)03-0237-05

Detection on the Sensitivity of Potato *Phytophthora infestans* to Metalaxyl and Cymoxanil

YUAN Shan-ku¹, ZHAO Zhi-hua¹, LU Xi-li^{1*}, LU Liang², JIANG Hui²

(1. Department of Plant Pathology, College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University,

Beijing 100094, China; 2. Center of Agrochemicals for Biological and Environmental Technology,

Institute for the Control of Agrochemicals, Ministry of Agriculture, Beijing 100026, China)

Abstract: In 2003 and 2004, 127 *Phytophthora infestans* isolates were sampled from Inner Mongolia and Heilongjiang, China, their sensitivities to metalaxyl and cymoxanil were determined *in vitro*. The results showed that the metalaxyl-sensitive (MS) isolated in 2003 from Inner Mongolia, 2003 and 2004 from Heilongjiang, covered 86.2%, 13.8% and 17.8%, respectively. Although cymoxanil has been used nearly for 10 years in these areas, but no any decreasing in sensitivity of *P. infestans* populations has been detected. Their EC_{50} values for cymoxanil ranged from 0.10 $\mu\text{g/mL}$ to 0.35 $\mu\text{g/mL}$, the mean EC_{50} value ($\pm SD$) was 0.20 (± 0.06) $\mu\text{g/mL}$ exhibited unimodal distribution of sensitivity, which could be used as the baseline-sensitivity for monitoring the field resistance development in the future. There was no cross-resistance between metalaxyl and cymoxanil in field populations of *P. infestans*. Cymoxanil gave equal effect on both metalaxyl-resistant and wild-sensitive isolates.

Key words: *Phytophthora infestans*; metalaxyl; cymoxanil; resistance; baseline-sensitivity

收稿日期: 2005-02-21; 修回日期: 2005-03-30

作者简介: 袁善奎 (1976-), 男, 湖北利川市人, 博士, 研究方向为杀菌剂药理学及病原菌抗药性; * 通讯作者: 刘西莉 (1969-), 女, 副教授. 联系电话: 010-62731013; E-mail: seedling@cau.edu.cn

基金项目: 中国博士后科学基金资助.

由致病疫霉菌 *Phytophthora infestans* 引起的晚疫病是制约马铃薯产业的主要因素之一,因生产上缺乏长期、有效的水平抗病品种,目前对马铃薯晚疫病的防治仍然依赖于化学药剂。继铜制剂、代森锰锌等保护性杀菌剂的使用之后,以甲霜灵和霜脲氰为代表的苯基酰胺类(Phenylamide fungicides, PAFs)和乙酰胺类内吸性杀菌剂开始被大量应用。苯基酰胺类杀菌剂 1977 年问世,2~3 年之后在爱尔兰、荷兰、瑞士等地的马铃薯田间就检测到抗 PAFs 的马铃薯晚疫病病菌,随后在世界各马铃薯种植区均有这类药剂对马铃薯晚疫病病菌的防治效果明显下降的报道^[1]。霜脲氰于 1976 年由美国杜邦公司开发,用于卵菌病害的防治,但对不同属病菌的活性差异较大,对葡萄霜霉病菌 *Plasmopara viticola* 和马铃薯晚疫病病菌的活性较高。

中国从 20 世纪 80 年代开始使用 PAFs 药剂防治马铃薯晚疫病,但对其抗药性研究较晚,缺乏系统的抗药性监测资料。李炜等研究发现,田间抗甲霜灵的马铃薯晚疫病病菌较敏感菌株的适合度高^[2]。Zhang 等检测了采自内蒙、河北、重庆、四川、云南等地共 134 株马铃薯晚疫病病菌对甲霜灵的敏感性,结果表明抗性菌株的频率达 14.9%,但这些抗性菌株均为中等抗性^[3],未检测到高水平抗性菌株。霜脲氰自 20 世纪 90 年代初开始在中国大量使用,大部分地区的用药历史在 10 年以上。国内外尚未见因抗药性而导致该药剂对马铃薯晚疫病田间防治效果下降的报道。笔者检测了 2003~2004 年采自内蒙和黑龙江地区的马铃薯晚疫病病菌对甲霜灵和霜脲氰的敏感性,现将检测结果报道于后。

1 材料和方法

1.1 培养基

黑麦蔗糖琼脂培养基(Rye Sucrose Agar, RSA)用于马铃薯晚疫病病菌的分离、培养及测定对药剂的敏感性,其制备方法为(每 1 000 mL):称取 60 g 黑麦(冬牧 70),加入 500 mL 蒸馏水在

25 °C 下浸泡 24~48 h;用双层纱布过滤,保留浸出液,并将黑麦加入 500 mL 蒸馏水后在搅拌机中捣碎 1~2 min;将浸出液和捣碎的黑麦一并在 60 °C 水浴中浸 1 h,然后用 4 层纱布过滤,保留滤液;在滤液中加入 15 g 琼脂和 20 g 蔗糖,煮沸溶解后分装,最后在 121 °C 下湿热灭菌 25 min 后备用。

1.2 病原菌

2003 年从黑龙江和内蒙的马铃薯田间采集马铃薯晚疫病病叶,共分离获得 58 株晚疫病病菌;2004 年从黑龙江分离获得 69 株病菌。所有菌株均来自不同田块,田块之间的距离在 1 km 以上,并分别挑取单游动孢子进行纯化,保存待试。

1.3 供试药剂

98% 甲霜灵(metalaxyl)原药由新加坡利农私人有限公司提供;98.1% 霜脲氰(cymoxanil)原药由江苏利民农化公司提供。以甲醇为溶剂,分别将两种原药配制成浓度为 5 000 μg/mL 母液,于 4 °C 冰箱中保存备用。

1.4 病菌对药剂的敏感性测定

采用打孔器在预培养好的病菌菌落边缘制取 Ø5 mm 的菌饼,分别接种到含甲霜灵 5、10、100 μg/mL 及无药(但含等量甲醇浓度)的 RSA 培养基平板上,每处理重复 3 次,19 °C 下黑暗培养 7 d 后测定菌落直径,并计算各菌株在不同甲霜灵浓度下的相对生长量(Percent of growth, PG, %)。

$$PG(\%) = 100 \times \frac{(\text{处理菌落直径} - 5)}{(\text{对照菌落直径} - 5)}$$

分别参照 Shattock^[4]和 Forbes^[5]的标准划分各菌株对甲霜灵的敏感性(表 1)。

采用生长速率法测定马铃薯晚疫病病菌对霜脲氰的敏感性^[6],计算各菌株的 EC₅₀ 值,并根据 EC₅₀ 值的分布判断田间是否出现对霜脲氰敏感性明显下降的病菌群体。此外,根据以上结果分析马铃薯晚疫病病菌对甲霜灵和霜脲氰之间有无交互抗药性。

Table 1 Metalaxyl-resistance division criteria published by Shattock(1988) and Forbes(1997)

Author	Metalaxyl-sensitive, MS	Metalaxyl-intermediate, MI	Metalaxyl-resistant, MR
Shattock	10 μg/mL: PG 10%	10 μg/mL: 10% < PG < 60%	10 μg/mL: PG 60%
Forbes	5 μg/mL: PG < 40%	5 μg/mL: PG 40%	5 μg/mL: PG 40%
	100 μg/mL: PG < 40%	100 μg/mL: PG < 40%	100 μg/mL: PG 40%

2 结果与分析

2.1 田间病菌群体对甲霜灵的抗药性情况

分别采用了 Shattock 和 Forbes 的标准划分了马铃薯晚疫病菌对甲霜灵的敏感性。结果表明,按照 Shattock 的标准可以区分 MS 和 MI 病菌,而按照 Forbes 的标准不能区分出 MI 病菌。因为按照 Shattock 标准得到的 MI 菌株在 5 μg/mL 和 10 μg/mL 浓度上的相对生长量均大于 10%,但小于 40%,没有达到 Forbes 的 MI 标准;Shattock 标准划分出的 MS 在 5 μg/mL 和 10 μg/mL 浓度上的相对生长量均小于 10%,在 Forbes 的标准中也划

分为 MS;两种标准对抗性水平较高的 MR 菌株的划分结果一致,这些菌株在 100 μg/mL 浓度上仍能正常生长。因此在以下的统计分析中采用了 Shattock 的标准。

从表 2 可以看出,2003 年从内蒙分离获得的菌株中,敏感菌株频率较高,达 86.2%;而 2003 年和 2004 年采自黑龙江的菌株,其敏感菌株的频率相对较低,抗性菌株 (MI+MR) 频率分别达到 86.2% 和 82.6%,说明黑龙江省马铃薯晚疫病菌对甲霜灵的抗药性已经非常严重。

Table 2 Occurrence of metalaxyl-resistant isolates of *P. infestans* sampled from InnerMongolia and Heilongjiang in 2003 and 2004*

Years	Provinces	Number of isolates	MS		MI		MI	
			Number	Frequency (%)	Number	Frequency (%)	Number	Frequency (%)
2003	InnerMongolia	29	25	86.2	1	3.5	3	10.3
2003	Heilongjiang	29	4	13.8	4	13.8	21	72.4
2004	Heilongjiang	69	12	17.4	6	8.7	51	73.9

* According to the standard of Shattock (1988).

2.2 田间病菌群体对霜脲氰的敏感性

从表 3 可以看出,采自同一年份的黑龙江菌株和内蒙菌株对霜脲氰的敏感性相近,不存在地区差异;此外,分别采自 2003 年和 2004 年的黑龙江

菌株对霜脲氰的敏感性也不存在差异。这些结果说明,不同地理来源和不同采集时间的马铃薯晚疫病菌对霜脲氰的敏感性不存在差异。

Table 3 Comparison of the sensitivity to cymoxanil of *P. infestans* populations sampled from InnerMongolia and Heilongjiang in 2003 and 2004

Years	Provinces	Number of strains	EC ₅₀ values for cymoxanil /μg · mL ⁻¹		
			Range	Means	SD
2003	InnerMongolia	29	0.11~0.35	0.21 a*	0.06
2003	Heilongjiang	29	0.10~0.34	0.21 a	0.07
2004	Heilongjiang	69	0.12~0.34	0.19 a	0.05

* Significance level with Duncan's test at P=0.05.

从上述不同年份不同地区采集的 127 个马铃薯晚疫病菌的 EC₅₀ 值分布图 (图 1) 可以看出,田间马铃薯晚疫病菌对霜脲氰的敏感性仍呈单峰曲线分布,未出现敏感性有差异的亚群体,它们的 EC₅₀ 值介于 0.10~0.35 μg/mL,最不敏感菌株是最敏感菌株的 3.3 倍,说明病菌群体对霜脲氰非常敏感,因此,本研究所测得的 127 个菌株的平均 EC₅₀ 值 (0.20 ±0.06 μg/mL) 可作为将来开展田间抗药性监测的敏感性基线。

2.3 田间病菌群体对甲霜灵和霜脲氰的交互抗药性

甲霜灵不同敏感性水平的马铃薯晚疫病菌对霜脲氰的敏感性分布见图 2,从中可以看出,MS 群体和 MR 群体的 EC₅₀ 值分布范围相近,均包括了 MI 群体的 EC₅₀ 值,其中 MS 群体的 EC₅₀ 值在 0.11~0.35 μg/mL 之间,平均为 0.19 (±0.06) μg/mL; MI 群体的 EC₅₀ 值在 0.13~0.32 μg/mL 之间,平均为 0.23 (±0.06) μg/mL; MR 群体的 EC₅₀ 值在

0.10~0.35 $\mu\text{g/mL}$ 之间,平均为 0.21 (± 0.06) $\mu\text{g/mL}$ 。以上结果说明田间病菌群体对霜脲氰的敏感性没有随着对甲霜灵敏感性的降低而出现有规律的下

降或上升,证明马铃薯晚疫病病菌对甲霜灵和霜脲氰之间没有正负交互抗药性,霜脲氰对抗甲霜灵菌株和敏感菌株有相同的活性。

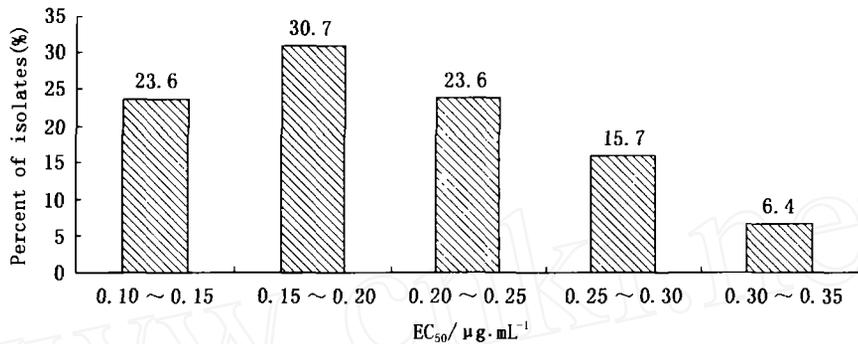


Fig 1 Sensitivity distribution of field *P. infestans* populations ($n = 127$) to cymoxanil

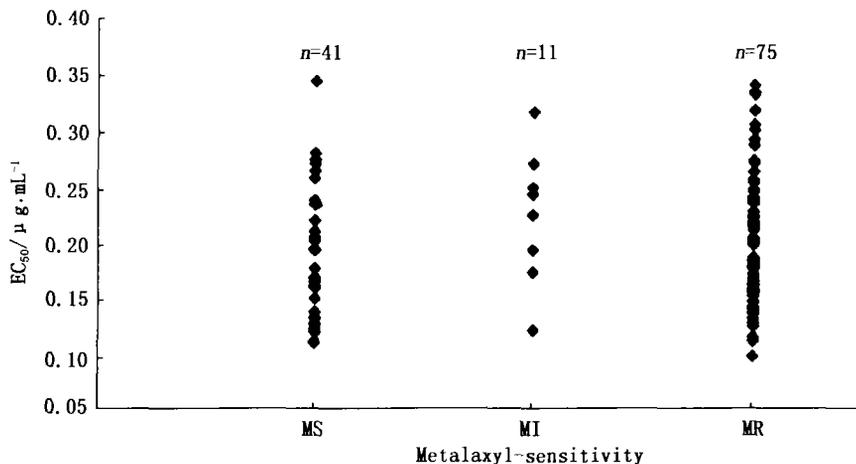


Fig 2 Sensitivity to cymoxanil of *P. infestans* isolates with different sensitivity to metalaxyl

3 讨论

甲霜灵在我国马铃薯晚疫病防治方面用药历史较长,因用药水平、采样地点及年份的差异,目前在中国各省份均已检测到不同频率的抗性菌株^[4,7-9],表明中国马铃薯主产区的晚疫病病菌对甲霜灵产生了严重的抗药性。作者连续两年在黑龙江省均检测到 80% 以上的抗药菌株 (MI+MR),因此甲霜灵在这些地区继续使用只会对病菌群体造成药剂选择压力,致使敏感群体越来越少,而抗性群体会急剧上升。建议生产上尽可能避免使用甲霜灵及与其有正交互抗药性的噁霜灵 (oxadixyl)、呋霜灵 (furalaxyl)、苯霜灵 (benalaxyl) 等其他苯基酰胺类杀菌剂的单剂防治该病,同时也尽量减少使用含有这类药剂的混配药剂。

尽管霜脲氰在内蒙古和黑龙江地区有近 10 年的用药历史,但在离体条件下测得 127 个菌株的平均 EC_{50} 值为 0.20 (± 0.06) $\mu\text{g/mL}$,这与 Hamlen 等研究的结果相近,其报道在田间应用霜脲氰之前马铃薯晚疫病病菌对该药剂的平均 EC_{50} 值为 0.19 (± 0.12) $\mu\text{g/mL}$,该药剂应用 16 年之后在田间也未检测到敏感性下降的群体^[10]。王文桥等在室内研究也发现,马铃薯晚疫病病菌经紫外线诱变 15 次和药剂驯化 8~11 次均未获得抗霜脲氰突变体,相反,药剂驯化 3 次即可获得抗噁霜灵的突变体^[11];作者在室内通过对菌丝块的紫外线诱变,虽然发现在 10 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下少数菌丝块边缘能形成扇形菌落,但重新转移至含药平板上抗性又丧失,不稳定。因此,离体抗药性风险评估和田间防治实践都已证明霜脲氰在防治马铃薯晚疫病方面为低抗药性风险,加之生产中又多与作用机制不

同的代森锰锌、噁唑菌酮 (famoxadone) 等混配使用,更加降低了田间的抗药性风险。

洪锡午等研究指出,甲霜灵等苯基酰胺类杀菌剂与霜脲氰具负交互抗性关系,即对苯基酰胺类杀菌剂未产生抗性的敏感菌株施用霜脲氰,其抑菌作用并不突出,而对苯基酰胺类杀菌剂抗性越高的病菌群体,应用霜脲氰进行防治则效果越显著^[13]。但作者的研究发现,对甲霜灵表现不同敏感性水平的菌株对霜脲氰的敏感性没有差异,即马铃薯晚疫病病菌对这两种药剂之间不存在正负交互抗性。

参考文献:

- [1] Gisi U. Resistance to phenylamide fungicides: a case study with *Phytophthora infestans* involving mating type and race structure [J]. *Annu Rev Phytopathol*, 1996, 34: 549-572.
- [2] LI Wei (李伟), ZHANG Zhiming (张志铭), LI Chuan (李川), et al. 马铃薯晚疫病病菌对瑞毒霉抗性的研究 [J]. *J Hebei Agric Univ* (河北农业大学学报), 1998, 21 (3): 53-60.
- [3] Zhang Z M, Li Y Q, Zhu J H, et al. Preliminary study on metalaxyl-resistant isolates of *Phytophthora infestans* in China [A]. Proceedings of the International Workshop on Potato Late Blight Pyongchang, Ganwon, Korea, 2001. 101-105.
- [4] Shattock R C. Studies on the inheritance of resistance to metalaxylin *Phytophthora infestans* [J]. *Plant Pathology*, 1988, 37: 4-11.
- [5] Forbes G A. Manual for Laboratory Work on *Phytophthora infestans* [M]. International Potato Center (CIP), 1997. 5-16.
- [6] YUAN Shan-kui (袁善奎), LIU Liang (刘亮), JIANG Hui (姜辉), et al. 5种杀菌剂对马铃薯晚疫病病菌部分发育阶段的影响 [A]. ZHOU Ming-Guo (周明国). Chemical Control of Plant Diseases in China (中国植物病害化学防治研究) [C]. Beijing (北京): China Agriculture Science and Technology Press (中国农业科学技术出版社), 2004. 212-219.
- [7] WANG Ying-hua (王英华), GUO Li-yun (国立耘), LIANG De-lin (梁德霖), et al. 马铃薯晚疫病病菌在内蒙古和甘肃的交配型分布及对几种杀菌剂的敏感性 [J]. *J China Agric Univ* (中国农业大学学报), 2003, 8 (1): 78-82.
- [8] BI Chao-wei (毕朝位), CHE Xing-bi (车兴璧), MA Jin-cheng (马金成), et al. 致病疫霉对甲霜灵抗性及其抗性水平测定 [J]. *J Southwest China Agric Univ* (西南农业大学学报), 2002, 24 (4): 307-309, 345.
- [9] ZHANG Zhiming (张志铭), CAO Chen-guang (曹晨光), WANG Hui-sheng (王慧生), et al. 呼伦贝尔市马铃薯晚疫病病菌 (*Phytophthora infestans*) 对甲霜灵抗药性的研究 [J]. *China Potato* (中国马铃薯), 2004, 18 (5): 272-273.
- [10] Hamlen R A, Power R J. Distribution of sensitivity responses to cymoxanil within global populations of *Phytophthora infestans* [J]. *Pestic Sci*, 1998, 53: 101-103.
- [11] WANG Wen-qiao (王文桥), LIU Guo-rong (刘国容), ZHANG Xiao-feng (张小风), et al. 葡萄霜霉病菌和马铃薯晚疫病病菌对三种杀菌剂的抗药性风险评估 [J]. *Acta Phytopathologica Sinica* (植物病理学报), 2000, 30 (1): 48-52.
- [12] Ziogas B N, Davidse L C. Studies on the mechanism of action of cymoxanil in *Phytophthora infestans* [J]. *Pestic Biochem Physiol*, 1987, 29: 89-96.
- [13] HONG Xi-wu (洪锡午). 植物病原菌抗药性研究进展 [J]. *Pesticide Science and Administration* (农药科学与管理), 1996, 17 (2): 25-26.

(Ed J N S H)