

甘肃省南瓜白粉病菌对己唑醇抗性诱导及抗性菌株生物学性状研究

梁巧兰, 魏列新, 柳利龙, 吴琼, 徐秉良*

(甘肃农业大学植物保护学院; 甘肃省农作物病虫害生物防治工程实验室, 兰州 730070)

摘要 为了解甘肃省裸仁美洲南瓜白粉菌对己唑醇敏感性及其抗性产生情况, 采用小林喷雾法对采自兰州、武威、景泰等地的 20 个南瓜白粉菌菌株对己唑醇的敏感性进行了测定, 利用紫外诱导、药剂驯化、先紫外后药剂驯化三种方法对敏感菌株进行了抗药性诱导, 并对抗性突变菌株的生物学性状及其对丙环唑、氟硅唑、腈菌唑和戊唑醇的交互抗性进行了研究。结果表明 20 个南瓜白粉菌菌株对己唑醇的敏感性存在一定差异, EC_{50} 值在 17.77~285.54 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内; 与其他两种诱导方法相比药剂驯化方法获得的抗性突变菌株的抗性倍数最高, 为 8.94 倍。敏感菌株和抗性突变菌株孢子萌发的最佳时间分别为 36 h 和 48 h; 抗性突变菌株产孢量和致病力明显高于敏感菌株; 适合度测定表明抗性突变菌株与敏感菌株之间存在竞争力, 孢子萌发率、芽管个数之间差异显著, 菌丝分支数、产孢量之间差异不显著; 抗性突变菌株在抗性突变菌株和敏感菌株混合比例为 80:20 的群体中, 存在频率比较稳定, 连续培养 7 代后仍占 85.69%; 己唑醇抗性突变菌株对丙环唑、氟硅唑、腈菌唑和戊唑醇 4 种药剂未表现出交互抗性。研究结果可为甘肃省防治南瓜白粉病提供理论依据。

关键词 裸仁美洲南瓜; 白粉菌; 己唑醇; 抗性诱导; 抗性菌株; 生物学性状; 交互抗性

中图分类号: S 481.4 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2017152

Resistance induction of *Podosphaera xanthii* in pumpkin to hexaconazole and biological characterization of its resistant strains in Gansu

LIANG Qiaolan, WEI Liexin, LIU Lilong, WU Qiong, XU Bingliang

(College of Plant Protection, Gansu Agricultural University, Biocontrol Engineering Laboratory of Crop Diseases and Pests of Gansu Province, Lanzhou 730070, China)

Abstract To understand the sensitivity and resistance of the pathogen powdery mildew in hull-less pumpkin to hexaconazole in Gansu Province, the sensitivity of 20 *Podosphaera xanthii* strains collected from the fields of Lanzhou, Wuwei, Jingtai and other places to hexaconazole were measured in pumpkin seedling leaves by small-seedling spray method; the resistance of sensitive strain to hexaconazole was induced by using three kinds of UV-induction, fungicide screening, UV-induction before fungicide screening methods and biological characterization of the resistant strains and its cross-resistance to propiconazole, myclobutanil, flusilazole, tebuconazole were also studied. The results indicated that there were some differences in the susceptibility of the 20 strains of *Podosphaera xanthii* to hexaconazole, with EC_{50} value from 17.77 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 285.54 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Compared with the other two methods, the resistance fold of the resistant mutant strains obtained by hexaconazole screening in the laboratory was the highest (8.94 fold). The optimum times for spore germination of sensitive strains and resistant mutant strains were 36 h and 48 h, respectively. The sporulation and pathogenicity of resistant strains were higher than those of sensitive strains, and there were significantly differences in conidial germination percentage and the number of germ tubes between resistant mutant strains and sensitive strains; however, the difference in their mycelial branch and sporulation rate were not significant. Resistant mutant strains were more stable in the mixed ratio of resistant and susceptible strains of 80:20, and still accounted for 85.69% after continuous cultivation for 7 genera-

收稿日期: 2017-04-27 修订日期: 2017-06-01

基金项目: 甘肃省财政厅项目[甘财教 2013(116)]; 国家自然科学基金(31460518); 甘肃省自然科学基金(1010RJZA164)

* 通信作者 E-mail: xubl@gsau.edu.cn

tions. Resistant mutant strains to hexaconazole exhibited no cross-resistance among the 4 kinds of triazole fungicides, *i. e.* propiconazole, myclobutanil, flusilazole, and tebuconazole. The results provided a theoretical basis for the efficient application of hexaconazole for the control of pumpkin powdery mildew in the field in Gansu Province.

Key words hull-less pumpkin; *Podosphaera xanthii*; hexaconazole; resistance induction; resistant strain; biological characterization; cross-resistance of triazole fungicide

裸仁美洲南瓜 *Cucurbita moschata* Duch. *ex* Lam. 为葫芦科南瓜属一年生草本植物。因其种子有种仁而无种皮,故而又称无壳南瓜,是一种比较罕见的变异类型。由于其营养丰富、用途广泛、经济效益高而发展非常迅速^[1]。目前,裸仁美洲南瓜在全国各地均有种植,产量约 180 万 t,占世界总产量的 1/3^[2],对提高农民收入和带动本地经济发展起到了重要作用。但是,白粉病 *Podosphaera xanthii* 的发生日趋严重,已成为我国乃至国外生产绿色南瓜的主要制约因素^[3-4]。南瓜白粉病不仅能降低植株的光合利用率,严重时还能使整株黄萎干枯,早衰死亡,最终导致南瓜产量和果实品质下降^[5-6]。目前,南瓜白粉病的防治主要采用化学药剂,化学药剂具有防治迅速、见效快等特点。三唑类杀菌剂是我国农业生产中防治瓜类白粉病的高效药剂,其中又以己唑醇防效最为突出^[7],具有高效、低毒、广谱和内吸活性,对多种真菌引起的病害具有保护和铲除作用^[8]。该药剂于 2004 年在我国登记用于防治黄瓜白粉病,具有用量少、对植株相对安全性高的特点,应用潜力较大。但由于三唑类杀菌剂具有共同的作用位点,长期、大量使用易使病原菌产生抗药性^[9]。1984 年用该类药剂防治瓜类白粉病菌表现出药效下降的现象^[10]。另据报道,三唑类杀菌剂还存在抗药性风险以及同类药剂之间的交互抗性问题^[11]。

目前针对瓜类白粉菌抗药性的研究,仅在黄瓜白粉病菌对己唑醇的抗性、室内采用离体叶片接种法连续 2 次使用己唑醇防治南瓜白粉病菌后,病原菌对 5%己唑醇 ME 产生了轻度抗性的报道^[7,9,12-13],而已唑醇等三唑类药剂尚未在南瓜田广泛应用,所以有必要对其抗药性风险进行评估。本研究测定了采自甘肃省不同地方的 20 株南瓜白粉病菌对己唑醇的敏感性;采用药剂驯化方法获得了对己唑醇的抗性突变菌株,对抗性突变菌株和敏感菌株的生物学性状、适合度进行了比较,并测定了己唑醇抗性突变菌株对 4 种三唑类杀菌剂的交互抗性。试验结果对指导己唑醇在南瓜白粉病防治中的科学合理应用具有

重要意义;同时,可为评估南瓜白粉病菌对己唑醇抗药性风险以及制定科学的抗药性治理措施奠定基础。

1 材料及方法

1.1 材料

供试药剂:95%己唑醇(hexaconazole)原药,江苏丰登农药有限公司;95%腈菌唑(myclobutanil)原药,漯河市新浩元农资有限公司;95%丙环唑(propiconazole)原药,温州绿佳化工有限公司;98%氟硅唑(flusilazole)原药,常熟恒耀新材料有限公司;98%戊唑醇(tebuconazole)原药,河南万山化工产品有限公司。

供试菌种:供试菌株从南瓜种植田中感染白粉病的南瓜上采集,其中兰州 9 株、武威 5 株、景泰 4 株,甘肃农业大学 1 株;甘肃农业大学农药实验室提供的室内培养的南瓜白粉病菌菌株(SY2)1 株。

供试品种:裸仁美洲南瓜感病品种‘天然’,由武威金苹果种业有限公司提供。

试验材料:光学显微镜、毛笔、紫外灯、烧杯、小型喷雾器、考马斯亮蓝、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate,简称 SDS)。

1.2 方法

1.2.1 南瓜白粉病菌对己唑醇敏感性测定及敏感菌株的获得

用环己酮和二甲基甲酰胺将农药原药溶解,然后加乳化剂 E 1-10 和 1602#,配制成有效成分质量分数为 5%的微乳剂,喷施时直接用水稀释至使用浓度。病害调查参考贾忠明的方法^[7]。采用小株喷雾法测定南瓜白粉病菌对己唑醇敏感性,将采自不同地方的南瓜白粉病菌孢子用毛笔刷下溶于 5 mL 含 0.1%SDS 的溶液中,接种在实验室盆栽的健康南瓜植株上(两叶期)。发病后将病原菌制成临时玻片在显微镜下观察病原菌形态,确定为南瓜白粉病病原后,取单个病斑接种到健康南瓜植株上进行白粉菌扩繁,将扩繁得到的白粉菌配成孢子悬浮液,孢子浓度为 50~60 个分生孢子/视野(10×10 倍),采

用涂抹法接种健康南瓜植株,3 d 后喷施系列浓度的己唑醇水稀释液(浓度分别为:1 000、500、250、125、62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、CK)。每浓度处理 10 株,重复 3 次,放置在室温下(25 $^{\circ}\text{C}$)培养 7 d,按下列分级标准调查病斑(表 1),并按下式计算病情指数和防治效果^[14]。

表 1 裸仁美洲南瓜白粉病分级标准

Table 1 Grading standards for pumpkin powdery mildew

级数 Grade	病斑面积 Diseased spot area	级数 Grade	病斑面积 Diseased spot area
0 级	无病斑	3 级	1/3 \leq 病斑占叶面积 $<$ 1/2
1 级	病斑占叶面积 $<$ 1/5	4 级	1/2 \leq 病斑占叶面积 $<$ 2/3
2 级	1/5 \leq 病斑占叶面积 $<$ 1/3	5 级	病斑占叶面积 \geq 2/3

发病率=接种发病叶片数/接种叶片总数 \times 100%;

病情指数= Σ (病叶数 \times 对应级数)/(调查总叶数 \times 最高级数) \times 100;

防治效果=(对照病情指数-处理病情指数)/对照病情指数 \times 100%。

将药液浓度换算成对数,为 x 值;以防治效果的几率值为 y 值,计算回归方程及 EC_{50} 。

1.2.2 南瓜白粉病菌抗药性突变菌株的获得

南瓜白粉菌对己唑醇抗性的诱导参考杨连来等^[12]的方法进行,略有修改。根据 1.2.1 毒力测定的结果,选取对己唑醇极敏感的菌株在实验室内接种培养作为敏感菌株,将其分生孢子配制成悬浮液,孢子浓度为 50~60 个分生孢子/视野(10 \times 10 倍),采用涂抹法接种在南瓜叶片上,在 25 $^{\circ}\text{C}$ 、RH 60%、4 400 lx 光照 12 h/d 的培养箱内培养 3 d 后,备用。

1.2.2.1 紫外诱导

接种敏感菌株后培养 3 d 的南瓜幼苗放在功率为 30 W 的紫外灯(波长 254 nm)下分别照射(预热 30 min,距离南瓜子叶 30 cm)2、3、4、5、5、10 min 后,放置在培养箱内 20 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗条件下培养 24 h 后转移到 25 $^{\circ}\text{C}$ 、RH 60%、4 400 lx 光照 12 h/d 的培养箱内继续培养,待产生大量孢子堆后,用毛笔扫下,配成孢子悬浮液再次接种,3 d 后用小型喷雾器均匀喷施系列浓度的己唑醇水稀释液,晾干后继续在培养箱内培养 7 d,有明显可见病斑后检查并记录叶片发病情况。按 1.2.1 中的方法检查病斑个数并计算药剂防治效果,求其 EC_{50} ,将紫外照射后获得的菌株 EC_{50} 与敏感菌株 EC_{50} 相比,计算抗性突变菌株的抗性倍数,抗性类别参考慕立义害虫抗药性类别制定,略有修改(表 2)^[15]。评价室内诱导的抗性突变菌株

的抗性水平,确定紫外线最佳诱导时间;选择抗性水平最高的菌株以筛选出的最佳诱导时间再通过紫外照射,连续诱变 7 代,记录第 1、3、5、7 代的抗性水平。孢子悬浮液浓度和培养条件同上。

抗性倍数 $RF = \text{抗性菌株 } EC_{50} / \text{敏感菌株 } EC_{50}$ 。

表 2 抗药性水平的判断标准

Table 2 Evaluation standards of resistance level

抗性倍数 Resistance fold	抗性水平 Resistance level	抗性倍数 Resistance fold	抗性水平 Resistance level
0 \leq RF $<$ 3	极敏感	10 \leq RF $<$ 40	中抗
3 \leq RF $<$ 5	敏感	40 \leq RF $<$ 160	高抗
5 \leq RF $<$ 10	低抗	RF \geq 160	极高抗

1.2.2.2 药剂驯化

用小型喷雾器向接种敏感菌株后培养 3 d 的南瓜幼苗均匀喷施系列浓度的己唑醇水稀释液,晾干后在培养箱内继续培养 7 d,检查并记录叶片发病情况。计算其 EC_{50} 。用毛笔扫下发病的孢子堆配成孢子悬浮液再次接种南瓜叶片,培养 3 d 后喷施浓度为 EC_{50} 值的己唑醇水稀释液,发病后获得的白粉菌孢子作为药剂驯化的第 1 代,如此连续驯化 7 代后,测定每一代的 EC_{50} 和抗性水平。孢子悬浮液浓度、培养条件和计算方法同上。

1.2.2.3 先紫外诱导后药剂驯化

按上述筛选出最佳诱导时间紫外诱导结束后,将产生的孢子堆配成孢子悬浮液接种在南瓜叶片上,以第 1 次药剂驯化所测得的敏感菌株 EC_{50} 作为药液浓度喷施处理接种发病的南瓜幼苗后,产生的白粉菌作为第 1 代诱导菌株,再用第 1 代诱导菌株接种南瓜幼苗,培养 3 d 后用紫外线照射相同的时间,然后喷施己唑醇水稀释液(浓度为第 1 代诱导菌株的 EC_{50}),重复上述步骤,共诱导 7 代,测定每一代的 EC_{50} 和抗性水平。孢子悬浮液浓度、培养条件和计算方法同上。

1.2.3 南瓜白粉病菌抗性突变菌株的生物学特性

1.2.3.1 抗性突变菌株的抗性稳定性测定

将上述药剂驯化获得的抗性突变菌株在不施药的情况下连续培养 5 代后,喷施系列浓度的己唑醇(浓度同 1.2.1),计算每代的 EC_{50} ,比较抗性水平的变化。

1.2.3.2 抗性突变菌株的生物学性状

选取对己唑醇极敏感的菌株在实验室内接种培养作为敏感菌株,以药剂驯化的为抗性突变菌株,观察两者的孢子萌发,将敏感菌株和抗性突变菌株的孢子悬浮液分别涂抹接种于南瓜叶片,在 25 $^{\circ}\text{C}$ 、RH

60%、4 400 lx 光照 12 h/d 的培养箱内培养,于接种后不同时间打取叶子圆片后按照 Kuzuyal 等^[16]所描述的方法观察并计算孢子萌发率,每 12 h 检查 1 次结果,试验重复 3 次,按下式计算孢子萌发率。

$$\text{孢子萌发率} = \frac{\text{萌发的孢子数}}{\text{孢子总数}} \times 100\%$$

敏感菌株和抗性突变菌株致病力和产孢量测定参考杨连来方法^[12]进行。接种的南瓜植株放置于 25℃、RH 60%、4 400 lx 光照 12 h/d 的培养箱内培养,7 d 后按表 1 中的分级标准调查发病情况,分别计算敏感菌株和抗性突变菌株的发病率和病情指数,重复 3 次。

1.2.4 抗性突变菌株适合度及其与敏感菌株的竞争力测定

参考杨连来等^[9]的方法进行,略有修改。将相同浓度的敏感菌株和抗性突变菌株孢子悬浮液(1×10^5 个/mL)分别涂抹接种在南瓜叶片上培养,于接种 40、52、96 h、发病 10 d 后显微镜下对抗性菌株和敏感菌株的分生孢子萌发率、分生孢子芽管数目、菌丝体的分支数目和病斑中分生孢子的数量进行适合度测定;竞争力测定中,将敏感菌株和抗性突变菌株的分生孢子悬浮液(1×10^5 个/mL),分别按照 20:80、50:50 和 80:20 体积比混合后,涂抹接种南瓜叶片,14 d 后收集分生孢子接种下一代,如此重复 1、3、7 代后,再将收集到的第 7 代分生孢子配制成悬浮液接种南瓜叶片,发病后用打孔器将单个病斑取下,漂浮在对敏感菌株具有最小抑制作用浓度(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的己唑醇药液中。然后放在光照培养箱中培养 7 d,观察病斑扩大情况,记录其数量,按下式计算抗药性菌株频率。以上数据均采用 SPSS 19.0 进行 LSD 法统计分析, $P < 0.05$ 。

抗药性菌株频率 = 病斑扩大的数量/打取叶片的总数量 $\times 100\%$ 。

1.3 己唑醇抗性突变菌株对 4 种三唑类杀菌剂的交互抗性

配制己唑醇 F₇ 代抗性突变菌株和敏感菌株的分生孢子悬浮液,涂抹接种于南瓜叶片上,96 h 后分别喷系列浓度的氟硅唑、丙环唑、戊唑醇和腈菌唑等药液,每处理重复 4 次,喷药 7 d 后调查统计南瓜叶片上的病斑数目,计算防治效果及抗性菌株和敏感菌株的 EC₅₀,并进行比较,求出抗性倍数(公式同 1.2.2.1 中抗性倍数计算公式),按表 2 中标准确定抗药性水平。

2 结果与分析

2.1 南瓜白粉病菌己唑醇敏感菌株的获得

对采自兰州市、武威、景泰和甘肃农业大学校园等不同地区的南瓜白粉菌 19 个菌株和 SY2 对己唑醇的敏感性进行了测定,结果表明这 20 个菌株对己唑醇敏感性存在一定差异,其中采自武威的菌株 EC₅₀ 最高达 285.54 $\mu\text{g}/\text{mL}$,甘肃农业大学的菌株 EC₅₀ 最低,为 17.77 $\mu\text{g}/\text{mL}$,相差 15.07 倍,其余各菌株的 EC₅₀ 介于两者之间;将采自甘肃农业大学的菌株 ND1 经室内接种南瓜幼苗培养扩繁 5 代后,测定其对己唑醇的 EC₅₀ 后发现,与 SY2 菌株的 EC₅₀ 相接近,为此以 SY2 作为己唑醇敏感菌株(表 3)。

表 3 南瓜白粉病菌对己唑醇的敏感性测定

Table 3 Sensitivity tests of 20 *Podosphaera xanthii* strains to hexaconazole

供试菌株 Isolate	毒力回归方程 Toxic regression equation	相关系数 Correlation coefficient	EC ₅₀ (95%置信区间)/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ EC ₅₀ (95% CL)
ND1	$y = 0.2738x + 4.6522$	0.9576	17.77(14.55~21.00)
SY2	$y = 0.7908x + 3.9677$	0.9482	20.20(16.90~24.14)
LZ3	$y = 0.9745x + 3.4273$	0.9848	41.10(35.65~47.39)
LZ4	$y = 1.0455x + 3.1830$	0.9093	54.69(48.08~62.22)
LZ5	$y = 1.3797x + 2.4325$	0.9384	70.95(65.07~77.36)
LZ6	$y = 1.7384x + 1.7823$	0.9563	72.60(65.56~80.39)
JT7	$y = 0.4837x + 4.0830$	0.9957	76.17(72.95~79.39)
WW8	$y = 1.6929x + 1.7838$	0.9807	79.40(73.04~86.32)
LZ9	$y = 1.5087x + 2.0930$	0.9535	84.50(76.91~92.83)
LZ10	$y = 0.4956x + 4.0414$	0.9964	85.95(61.25~120.59)
JT11	$y = 1.5236x + 2.0139$	0.9735	87.69(81.08~94.83)
JT12	$y = 1.9453x + 1.2204$	0.9622	91.17(83.82~99.16)
WW13	$y = 2.1487x + 0.7626$	0.9504	93.77(87.12~100.93)
WW14	$y = 2.0666x + 0.8875$	0.9795	98.13(91.27~105.50)
WW15	$y = 1.1955x + 2.4802$	0.9971	118.01(109.49~127.19)
LZ16	$y = 2.0118x + 0.8137$	0.9875	128.16(127.20~129.12)
JT17	$y = 1.9478x + 0.8096$	0.9488	141.69(131.85~152.27)
LZ18	$y = 2.1458x + 0.0652$	0.9252	199.41(186.54~213.17)
LZ19	$y = 1.1361x + 2.3353$	0.9699	221.55(198.13~247.75)
WW20	$y = 1.4478x + 1.4413$	0.9987	285.54(260.63~312.84)

2.2 南瓜白粉菌对己唑醇抗性的获得

2.2.1 紫外照射不同时间对南瓜白粉菌抗性突变体的诱导

通过紫外线对以上敏感性测定获得的南瓜白粉病菌敏感菌株 SY2 照射不同时间后,获得了南瓜白粉病菌抗性突变菌株,且随着紫外线照射时间的增加,南瓜白粉病菌对己唑醇抗性倍数呈现先升后降的变化趋势,其中以照射 2 min 时所获得的抗性倍数最低,为 1.39,照射 3 min 所获得的抗性倍数最高,为 2.53,其他照射时间的抗性倍数均低于 2.53,分别为 1.81、

1.73 和 1.67, 而且照射时间超过 3 min 后南瓜幼苗死亡严重, 因此, 紫外线最佳照射诱导时间为 3 min (图 1)。

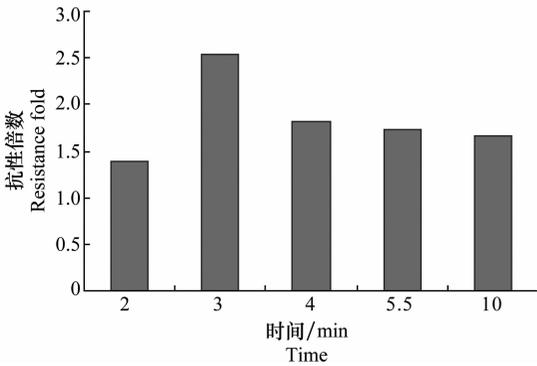


图 1 紫外照射时间对南瓜白粉菌对己唑醇抗性倍数的影响
Fig. 1 Effects of different durations of ultraviolet irradiation on resistance fold of *Podosphaera xanthii* to hexaconazole

2.2.2 抗性突变菌株诱导方法比较

通过对三种方法诱导南瓜白粉病菌 SY2 菌株对己唑醇产生抗性的比较, 发现三种方法均能获得抗性突变菌株(每种方法诱导获得 1 株), 随着抗性诱导代数的增加, 抗性倍数逐渐增大, 其中药剂驯化方法获得的抗性突变菌株的抗性倍数最高, 且与其他两种方法诱导产生的抗性突变菌株抗性倍数之间存在极显著差异(表 4)。

2.3 南瓜白粉病菌抗性突变菌株稳定性测定

通过对己唑醇药剂驯化获得的抗性突变菌株抗性稳定性测定, 结果表明将抗性突变菌株(F_7 , RF=8.94)连续培养 5 代后(F_8 、 F_9 、 F_{10} 、 F_{11} 、 F_{12}), 其抗性倍数相对于 F_7 菌株的抗性倍数差异不大, 表明抗性稳定性较好(图 2)。

表 4 南瓜白粉菌抗性诱导三种方法比较¹⁾

Table 4 Comparison of three kinds of induced resistant strains to *Podosphaera xanthii*

方法 Method	诱导培养代数及抗性倍数 Culture generations after induction and resistance fold			
	F_1	F_3	F_5	F_7
紫外诱导 UV-induction	(2.53±0.37)bB	(4.44±0.53)bB	(5.27±0.39)bB	(6.86±0.41)bB
药剂驯化 Fungicide screening	(4.50±0.44)aA	(5.38±0.51)aA	(7.12±0.43)aA	(8.94±0.80)aA
先紫外诱导后药剂驯化 UV-induction before fungicide screening	(2.73±0.49)bB	(3.42±0.61)cC	(4.74±0.46)cB	(5.95±0.76)bB

1) 小写和大写字母分别表示同列数据在 0.05 和 0.01 水平的差异显著性。

Data in the same column followed by lowercase and capital letters indicate significant difference at 0.05 and 0.01 levels, respectively.

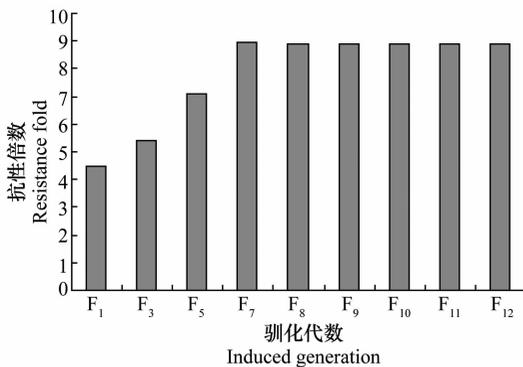


图 2 南瓜白粉菌抗性菌株对己唑醇的抗性稳定性
Fig. 2 Stability of resistant strains of *Podosphaera xanthii* to hexaconazole

2.4 南瓜白粉菌抗性突变菌株生物学性状研究

2.4.1 南瓜白粉菌敏感菌株和抗性突变菌株孢子萌发观察

通过对己唑醇药剂驯化获得的抗性突变菌株(F_7 , RF=8.94)孢子萌发率测定, 结果表明敏感菌株(SY2)和抗性突变菌株均在接菌 8 h 后开始萌发; 其萌发的最佳时间分别为 36 h 和 48 h, 孢子萌发率分别达到 13.58% 和 16.26%。方差分析表明, 抗性

突变菌株和敏感菌株孢子萌发率在 48 h 差异极显著, 其他时间差异不显著(图 3, 表 5)。

表 5 敏感菌株和抗性突变菌株的孢子萌发率¹⁾

Table 5 Ratios of pycnidiospore germination of sensitive and resistant mutant strains of *Podosphaera xanthii*

时间/h Time	孢子平均萌发率/% Average germination percentage of conidia	
	敏感菌株 Sensitive strain	抗性突变菌株 Resistant mutant strain
12	(10.66±0.76)aA	(10.84±1.48)aA
24	(8.69±2.03)aA	(9.92±0.41)aA
36	(13.58±1.30)aA	(14.00±1.13)aA
48	(11.20±1.00)bB	(16.26±0.45)aA

1) 小写和大写字母分别表示同行数据在 0.05、0.01 水平上的差异显著性。

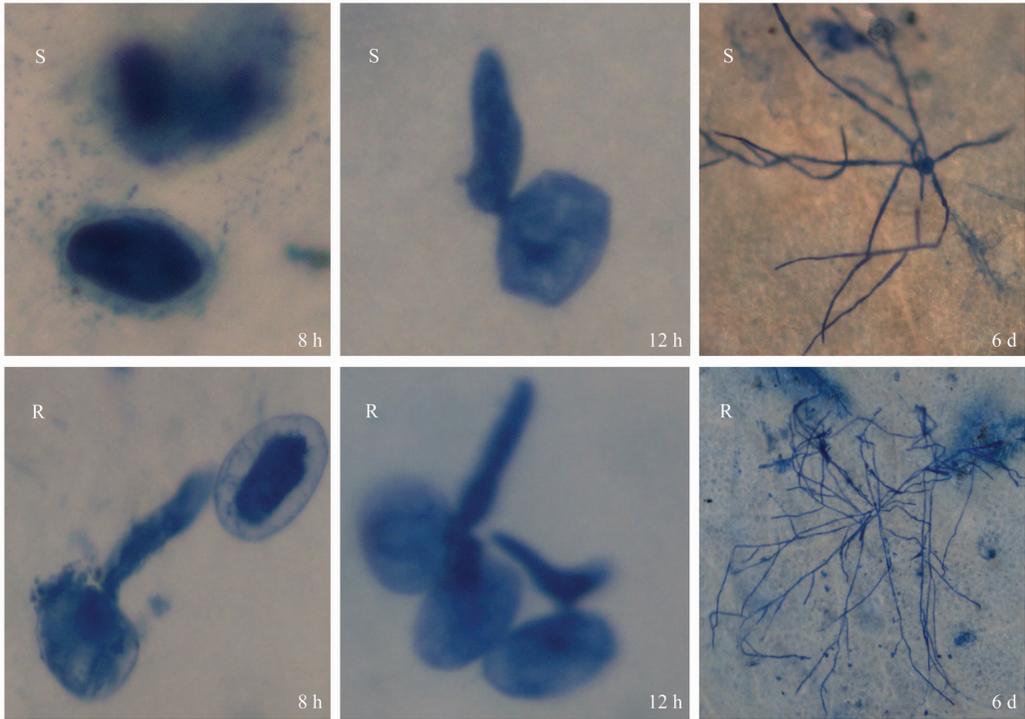
Data in the same line followed by lowercase and capital letters indicate significant difference at 0.05 and 0.01 levels, respectively.

2.4.2 敏感菌株和药剂驯化菌株致病力和产孢量的测定

通过致病力测定, 结果表明随着药剂驯化次数的增加, 诱导菌株的发病率和病情指数均高于敏感菌株, 第 1、3、5、7 代药剂驯化菌株的发病率分别比敏感菌株(SY2)提高了 1.71%、16.00%、12.55% 和

15.65%；病情指数分别比敏感菌株的高 3.16、7.31、5.95、13.48，表明药剂驯化菌株的致病力随着药剂驯化次数的增加而增强。方差分析表明，第 7 代驯

化菌株和敏感菌株的发病率和平均病情指数之间差异极显著，其他各代的发病率和病情指数介于两者之间(表 6)。



S: 敏感菌株; R: 抗性突变菌株
S: Sensitive strain; R: Resistant mutant strain

图 3 南瓜白粉病菌敏感菌株与抗性突变菌株孢子的萌发情况比较

Fig. 3 Germination courses of spores between sensitive and resistant mutant strains of *Podosphaera xanthii*

对敏感菌株和药剂驯化菌株产孢量测定结果表明，随着药剂驯化次数的增加抗性突变菌株后代的产孢量相对于敏感菌株(SY2)有所增加，接种 10 d 后第 1、3、5、7 代药剂驯化的抗性突变菌株产孢量分别比敏

感菌株高 1.07×10^5 、 1.21×10^5 、 1.28×10^5 、 1.85×10^5 个/mL。方差分析结果表明第 7 代药剂驯化的抗性突变菌株(F₇)产孢量与敏感菌株(SY2)的产孢量之间存在显著差异，其他菌株产孢量介于两者之间(表 6)。

表 6 敏感菌株和药剂驯化不同代菌株致病力的测定¹⁾

Table 6 Pathogenicity of sensitive and different generation of screening strains of *Podosphaera xanthii*

菌株 Strain	平均发病率/% Average incidence	平均病情指数 Average disease index	平均产孢量/ $\times 10^5$ 个 \cdot mL ⁻¹ Mean of sporulation quantity
敏感菌株 Sensitive strain	(84.00 ± 2.51)bB	(35.24 ± 1.59)cB	(2.36 ± 0.21)bA
第 1 代驯化菌株 F ₁ screening strain	(85.71 ± 2.47)bB	(38.40 ± 2.28)bcB	(3.43 ± 0.60)abA
第 3 代驯化菌株 F ₃ screening strain	(100.00 ± 0.00)aA	(45.71 ± 1.78)abAB	(3.57 ± 0.29)abA
第 5 代驯化菌株 F ₅ screening strain	(96.55 ± 1.66)aA	(44.35 ± 2.47)abcAB	(3.57 ± 0.63)abA
第 7 代驯化菌株 F ₇ screening strain	(99.65 ± 0.61)aA	(51.88 ± 2.76)aA	(4.21 ± 0.67)aA

1) 小写和大写字母分别表示在 0.05 和 0.01 水平的差异显著性。

Data followed by lowercase and capital letters indicate significant difference at 0.05 and 0.01 levels, respectively.

2.4.3 抗药性菌株适合度的测定

通过己唑醇药剂驯化第 7 代的白粉菌抗性突变菌株(F₇, RF=8.94)适合度测定，结果表明抗性突变菌株在孢子萌发率、芽管个数、菌丝的分

支数目和产孢量等方面均高于敏感菌株，其中药剂驯化菌株和敏感菌株的孢子萌发率、芽管个数之间差异显著，而菌丝的分支数目、产孢量差异不显著(表 7)。

表 7 南瓜白粉菌抗性突变菌株和敏感菌株对己唑醇的适合度参数

Table 7 Fitness parameters of *Podosphaera xanthii* sensitive and resistant mutant strains to hexaconazole

菌株 Strain	孢子萌发率/% Germination percentage of conidia	分生孢子芽管数/个 Numbers of germination tube of conidia	菌丝分支数/个 Branch number per hypha	产孢量/ $\times 10^4$ 个 \cdot mL $^{-1}$ Sporulation quantity
抗性菌株 Resistant strain	(13.44 \pm 1.31)aA	(2.55 \pm 0.06)aA	(3.24 \pm 0.11)aA	(6.25 \pm 0.68)aA
敏感菌株 Sensitive strain	(10.71 \pm 0.72)bA	(2.21 \pm 0.01)bA	(2.71 \pm 0.30)aA	(4.25 \pm 0.40)aA

2.4.4 敏感菌株和抗性突变菌株分生孢子竞争能力的测定

使用药剂驯化后获得的抗性突变菌株(F_7 , RF=8.94)和敏感菌株之间的竞争力测定结果表明,抗性突变菌株和敏感菌株等量混合培养中,抗性突变菌株的频率在混合群体中逐渐下降,但培养 7 代后,仍然有 30% 的抗性突变菌株存在;混合比例在 20:80 的处理培养 7 代后,只有 2.47% 的抗性突变菌株存在;混合比例在 80:20 的处理中,抗性突变菌株的频率在混合群体中变化趋势是先上升后缓慢下降再上升,但变化幅度不大,培养 7 代后仍有 85.69% 的抗性突变菌株存在,表明抗性频率基本保持稳定(表 8)。

表 8 南瓜白粉病菌抗性突变菌株和敏感菌株分生孢子竞争力测定

Table 8 Competition ability of *Podosphaera xanthii* conidia between sensitive and resistant mutant strains

培养代数 Culture generation	抗性突变菌株频率/% Frequency of resistant mutant strain		
	80:20	50:50	20:80
F_1	73.33	63.16	28.77
F_3	87.76	44.12	13.11
F_5	79.23	40.58	5.66
F_7	85.69	31.03	2.47

2.5 己唑醇抗性突变菌株对 4 种三唑类杀菌剂的交互抗性

己唑醇抗性突变菌株对丙环唑、氟硅唑、腈菌唑和戊唑醇的抗性水平分别为 2.86、1.09、1.85 和 1.04,表明己唑醇抗性突变菌株对这 4 种药剂

未表现出交互抗性(表 9)。

3 讨论

南瓜白粉病是南瓜种植中发生和危害较重的病害之一,由于用药频繁,致使病原菌对药剂产生了不同程度的抗性,防效大幅度降低。因此对白粉病菌进行抗药性监测和筛选更高效药剂是一项长期工作。在抗性试验中,建立敏感基线最为重要,是抗药性鉴别和监测的基础。南瓜白粉病菌是专性寄生菌,无法离体培养,选择合适的材料和方法最为重要,国外 Bardin 等^[17]和 Mcgrath 等^[18]采用固体培养基子叶叶盘法进行抗性测定,国内严红等^[19]采用子叶法监测了北京地区瓜类白粉病菌对三唑酮的抗性。为了明确兰州市周边地区南瓜白粉菌对己唑醇的敏感性现状,分别采集、分离了 19 个南瓜白粉菌菌株,采用小株喷雾法测定了其对己唑醇的敏感性。结果表明 19 个白粉菌株对己唑醇表现为极敏感、敏感、低抗、中抗,EC₅₀ 在 17.77~285.54 μ g/mL 范围内。对敏感菌株采用三种方法进行了抗药性诱导,共获得 3 株抗性突变菌株,其中药剂驯化获得的抗性突变菌株的抗性倍数最高,先紫外诱导后药剂驯化的菌株抗性倍数最低,紫外诱导的菌株抗性倍数介于两者之间,随着诱导代数的增加,3 种驯化方法诱导的菌株抗性倍数逐渐增大,其中药剂驯化第 7 代的抗性倍数最大,为 8.94,表现为低度抗性,这与在实验室采用离体叶片法连续两次使用 5% 己唑醇微乳剂后产生低度抗性的结果相一致^[13]。

表 9 己唑醇抗性突变菌株对 4 种三唑类杀菌剂交互抗性测定

Table 9 Tests of cross-resistance of 4 triazole fungicides

药剂 Triazole fungicide	抗性突变菌株 EC ₅₀ / μ g \cdot mL $^{-1}$ EC ₅₀ of resistant strain	敏感菌株 EC ₅₀ / μ g \cdot mL $^{-1}$ EC ₅₀ of sensitive strain	抗性倍数(R/S) Resistance index
丙环唑 propiconazole	1 265.92	441.98	2.86
氟硅唑 flusilazole	1 011.36	929.39	1.09
腈菌唑 myclobutanil	114.57	61.93	1.85
戊唑醇 tebuconazole	1 570.48	1 504.87	1.04

敏感菌株、抗性突变菌株生物学特性测定表明其孢子萌发最佳时间分别为 36 h 和 48 h;且抗性突

变菌株的产孢量和致病力明显高于敏感菌株,其适合度在孢子萌发率、芽管个数与敏感菌株的差异显

著;抗性突变菌株和敏感菌株之间的竞争力测定表明,在培养7代后抗性突变菌株的频率在80:20混合群体比较稳定,为85.69%,在20:80混合群体中(抗性菌株:敏感菌株)不稳定,只有2.47%的抗性突变菌株存在;这与杨连来等报道的研究结果一致^[9];实际生产中抗药性能否产生与病原菌抗性突变体出现的频率有关^[20],本试验也表明抗性突变菌株与敏感菌株的竞争力可能与它们各自在病原菌群体中的比例有关,当己唑醇抗性突变菌株在病原菌群体中占80%时,即使离开药剂的选择压力,它仍然保持较高频率。

目前,国内外对禾谷类作物白粉病菌 *Erysiphe graminis* 的抗药性研究较多,结果均是由于病菌潜育期短、再侵染频繁、流行速度快,同时,病原菌群体本身也具有很高的潜在适应力,对杀菌剂产生了抗性,表现出对三唑类杀菌剂的敏感性大幅度降低;另据 Collins 等^[21]对禾谷类白粉病菌的研究发现,三唑类杀菌剂品种之间存在交互抗性,而在本研究中,己唑醇诱导的抗性菌株对丙环唑、氟硅唑、腈菌唑和戊唑醇均未表现出交互抗性,表明在南瓜生产中只要科学合理地使用上述5种三唑类杀菌剂不仅可以有效防治南瓜白粉病,同时还可延缓白粉菌抗药性的产生,延长三唑类杀菌剂防治白粉病的使用寿命。

综上所述,兰州周边不同地区19个南瓜白粉病菌株和SY2对己唑醇的敏感性存在一定差异,EC₅₀值在17.77~285.54 μg/mL范围内;通过己唑醇诱导敏感菌株SY2 7代后,获得了抗性突变菌株,抗性突变菌株产孢量和致病力明显高于敏感菌株;适合度测定表明抗性突变菌株与敏感菌株之间存在竞争力,两者孢子萌发率、芽管个数差异显著,而菌丝分支、产孢量差异不显著;在抗性突变菌株和敏感菌株混合比例为80:20的群体中,抗性菌株存在频率比较稳定,连续培养7代后仍占85.69%;己唑醇抗性菌株对丙环唑、氟硅唑、腈菌唑和戊唑醇4种药剂未表现出交互抗性。

本试验采用室内盆栽试验,仅对兰州周边的19个南瓜白粉病菌株及SY2对己唑醇的敏感性、抗性诱导方法和诱导获得的抗性突变菌株生物学特性、己唑醇抗性突变菌株对4种三唑类杀菌剂交互抗性进行了测定,对于其他地区南瓜白粉病菌对己唑醇

的敏感性、田间抗药性试验以及与其他农药交互抗性问题尚未涉及;另外三唑类杀菌剂由于作用位点相同,在实际生产应用中极易产生交互抗性,但本试验中对己唑醇产生抗性的白粉菌并没有对丙环唑、氟硅唑、腈菌唑和戊唑醇表现出抗性,有关这些问题还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 王洪伟,徐亚琴.南瓜功能成分研究进展[J].食品与机械,2004,20(4):55-57.
- [2] 王鸣.南瓜属一多样性(Diversity)之最[J].中国西瓜甜瓜,2002(3):42-45.
- [3] 梁巧兰,徐秉良,颜惠霞,等.南瓜白粉病病原菌鉴定及寄主范围测定[J].菌物学报,2010,29(5):636-643.
- [4] 周威,李彩霞,王飞,等.白粉病菌入侵对不同抗性南瓜品种的病理和生理影响[J].安徽农业科学,2007,35(6):1711-1713.
- [5] 中国农业百科全书总编辑委员会蔬菜卷编辑委员会,中国农业百科全书编辑部.中国农业百科全书(蔬菜卷)[M].北京:农业出版社,1990:7-13.
- [6] 吕佩珂,李明远,吴钜文,等.中国蔬菜病虫原色图谱[M].北京:农业出版社,1992:17-18.
- [7] 贾忠明,刘峰,慕卫,等.黄瓜白粉病菌接种及对杀菌剂敏感性测定方法[J].植物保护学报,2006,33(1):99-103.
- [8] 廖金海.南瓜白粉病的危害与防治技术[J].现代农业科技,2005(6):45-46.
- [9] 杨连来,刘玮玮,刘跃群,等.黄瓜白粉病菌对己唑醇的敏感基线及实验室抗性获得[J].植物保护学报,2007,34(4):431-435.
- [10] HUGGENBEGER F, COLLINS M A, SKYLAKAKIS G. Decreased sensitivity of *Sphaerotheca fuliginea* to fenarimol and other ergosterol biosynthesis inhibitor[J]. Crop Protection, 1984, 3(2): 137-149.
- [11] KENDALL S J. Cross-resistance of triadimenol resistant fungal isolates to other sterol C-14 demethylation inhibitor fungicides [C]// Brighton Crop Protection Conference-pests & Diseases, 1986: 539-547.
- [12] 杨连来,慕卫,刘峰,等.黄瓜白粉病菌对己唑醇抗性诱导及抗性菌株生物学性状的研究[J].农药学学报,2007,9(1):29-33.
- [13] 梁巧兰,魏列新,徐秉良.裸仁美洲南瓜白粉病菌对几种杀菌剂敏感性及其抗性诱导[J].农药,2012,51(11):840-844.
- [14] 方中达.植物病害研究法[M].第3版.北京:中国农业出版社,1998.
- [15] 慕立义.植物化学保护研究法[M].北京:中国农业出版社,1991.
- [16] KUZUYAL M, HOSOYA K, YASHIRO K, et al. Powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) resistance in melon is selectable at the haploid level [J]. Journal of Experimental Botany, 2003, 54 (384): 1069-1074.

社,1998.

[11] 邹琦. 植物生理生化实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995:30-32.

[12] 胡玮. 钾对番茄部分抗性生理指标的影响及其对根结线虫的防治效果[D]. 北京: 中国农业科学院, 2010.

[13] 宾淑英, 冯志新. 花生根结线虫对花生的致病性研究[J]. 防护林科技, 1993(1):7-13.

[14] 黄娟华, 卓侃, 林柏荣, 等. 温度和初始种群密度对象耳豆根结线虫感染番茄的影响[J]. 植物保护, 2013, 39(5):177-180.

[15] 张锋, 李英梅, 洪波, 等. 温度和初始接种量对南方根结线虫侵染力的影响[J]. 中国生态农业学报, 2012, 20(12):1631-1635.

[16] MISHRA N P, MISHRA R K, SINGHAL G S. Changes in the activities of antioxidant enzymes during exposure of intact wheat leaves to strong visible light at different temperature in the presence of protein synthesis inhibitors [J]. Plant Physiol-

ogy, 1993, 102(3): 903-908.

[17] HOU E, STARR J L. A comparison of the damage functions, root galling, and reproduction of *Meloidogyne inconnita* on resistant and susceptible cotton cultivars[J]. Journal of Cotton Science, 2003, 7(4): 224-230.

[18] 叶德友, 钱春桃, 贾媛媛, 等. 黄瓜及其近缘种对南方根结线虫的抗性及其酶响应变化的研究[J]. 园艺学报, 2009, 36(12):1755-1760.

[19] 王冰林, 韩太利, 李媛媛. 根结线虫侵染对茄子苗期生理生化反应的影响[J]. 北方园艺, 2012(23):139-142.

[20] 张丹丹. 油菜素内酯提高黄瓜对根结线虫抗性的机制研究及田间效应[D]. 杭州: 浙江大学, 2012.

[21] 李青青, 漆永红, 曹素芳, 等. 南方根结线虫侵染对豇豆叶部 and 根系部分生理生化指标的影响[J]. 西北农业学报, 2014, 23(2): 49-54.

(责任编辑: 田 喆)

(上接 94 页)

[17] BARDIN M, NICOT P C, NORMAND P, et al. Virulence variation and DNA polymorphism in *Sphaerotheca fuliginea*, causal agent of powdery mildew cucurbits [J]. European Journal of Plant Pathology, 1997, 103: 545-554.

[18] MCGRATH M T, STANISZEWSK H, SHISHKOFF N. Fungicide sensitivity of *Sphaerotheca fuliginea* populations in the united states [J]. Plant Disease, 1996, 80: 697-703.

[19] 严红, 李兴红, 张涛涛, 等. 北京地区瓜类白粉病菌对三唑酮和多菌灵的抗药性监测[M]//中国植物病害化学防治研究, 第

三卷. 北京: 中国农业科技出版社, 2002.

[20] BALLANTYNE B. Powdery mildew on Cucurbitaceae: Identity, distribution, host range and sources of resistance [J]. Proceedings of Linnean Society of New South Wales, 1975, 99(2): 100-120.

[21] COLLINS P, BROWN J K M. Resistance and cross resistance of *Erysiphe graminis* to triazole and morpholine fungicides [C]// The First International Powdery Mildew Conference. Avignon, France, 1994: 41.

(责任编辑: 田 喆)

(上接 104 页)

参考文献

[1] 全林发, 张怀江, 孙丽娜, 等. 杀虫剂对害虫的亚致死效应研究进展[J]. 农学学报, 2016, 6(5): 33-38.

[2] 范仁俊. 北方果树食心虫发生规律与控制[M]. 北京: 中国农业出版社, 2015:187.

[3] 马爱红, 李文林, 路子云, 等. 桃树梨小食心虫发生危害及综合防治[J]. 河北农业科学, 2016, 20(4):27-29.

[4] 蔡明飞, 沈健, 仵均祥. 不同杀虫剂对梨小食心虫卵和成虫的室内防效[J]. 果树学报, 2010, 27(4):636-640.

[5] 陈静, 张建萍, 单长林. 蟠桃园梨小食心虫药剂筛选试验[J]. 陕西农业科学, 2010(6):61-63.

[6] 田忠正, 丁茜, 仵均祥. 10 种杀虫剂对梨小食心虫 *Grapholita molesta* (Busck) 卵的室内触杀效果[J]. 西北农业学报, 2015, 24(9):140-144.

[7] 张勇, 李爱华, 单公华, 等. 氯虫苯甲酰胺防治枣树桃小食心虫研究[J]. 山西农业科学, 2010, 38(5):55-56.

[8] 张坤朋, 王相宏, 李建华, 等. 不同剂量药剂防治山楂梨小食心虫的综合效益评价[J]. 河南农业科学, 2016, 45(8):86-90.

[9] 张怀江, 仇贵生, 闫文涛, 等. 氯虫苯甲酰胺对苹果树主要害虫的控

制作用及天敌的影响[J]. 环境昆虫学报, 2011, 33(4):493-501.

[10] 王芳, 庾琴, 郭贵明, 等. 梨小食心虫幼虫龄数和龄期的划分[J]. 应用昆虫学报, 2016, 53(2):390-395.

[11] 徐小龙, 徐的进, 徐广春. 氯虫苯甲酰胺对斜纹夜蛾的亚致死不同致死效应[J]. 江苏农业科学, 2010(1):139-140.

[12] 欧善生, 梁沛, 宋敦伦, 等. 氯虫苯甲酰胺亚致死剂量对棉铃虫生长发育和解毒酶活性的影响[J]. 植物保护, 2012, 38(4):1-8.

[13] 张琴, 王少丽, 杨愿愿, 等. 氯虫苯甲酰胺对甜菜夜蛾敏感基线的测定和幼虫体重的影响[J]. 长江蔬菜, 2010(18):87-89.

[14] 韩文素, 张树发, 沈福英, 等. 高效氯氟菊酯对小菜蛾阿维菌素抗性、敏感种群的亚致死效应[J]. 环境昆虫学报, 2011, 33(3): 335-341.

[15] 徐广春. 五种常用杀虫剂对灰飞虱种群的影响[D]. 扬州: 扬州大学, 2008.

[16] 王晓容, 田世尧, 杨森辉, 等. 人工饲料饲养的甜菜夜蛾发育、蛹重、产卵与存活[J]. 华中农业大学学报, 1998, 17(5):447-451.

[17] 庾琴, 王芳, 张润祥, 等. 梨小食心虫蛹重对成虫繁殖力和寿命及下一代幼虫发育的影响[J]. 昆虫学报, 2016, 59(9):985-990.

[18] 张振飞, 黄炳超, 张扬, 等. 几种农药对三化螟室内与田间防治效果研究[J]. 现代农药, 2011, 10(1):51-57.

(责任编辑: 田 喆)