

• 研究论文 •

三种羧酸酰胺类杀菌剂对黄瓜疫霉菌不同发育阶段的影响及其敏感性测定

朱书生^{1,2}, 陈磊¹, 卢晓红¹, 李健强¹, 刘西莉^{* 1}

(1. 中国农业大学 农学与生物技术学院, 北京 100193)

2 云南农业大学 教育部农业生物多样性与病害控制重点实验室, 昆明 650201)

摘要: 离体条件下测定了3种羧酸酰胺类(Carboxylic acid amides CAA s)杀菌剂氟吗啉、烯酰吗啉和异丙菌胺对黄瓜疫霉菌不同生长发育阶段的抑制作用。结果表明,3种杀菌剂抑制黄瓜疫霉菌休止孢萌发的EC₅₀值分别为0.54, 0.46和0.34 μg/mL; 抑制菌丝生长的EC₅₀值分别为0.92, 0.70和0.67 μg/mL; 抑制孢子囊形成的EC₅₀值分别为0.48, 0.31和0.26 μg/mL。但对游动孢子的释放、游动及休止孢的形成均没有抑制作用。氟吗啉、烯酰吗啉和异丙菌胺抑制田间采集的供试菌株菌丝生长的平均EC₅₀值分别为1.09(±0.24), 0.29(±0.04)和0.32(±0.07) μg/mL, 供试菌株对3种杀菌剂的敏感性均呈正态分布,未检测到抗药性菌株的存在。

关键词: 氟吗啉; 烯酰吗啉; 异丙菌胺; 黄瓜疫霉菌; 生物活性; 敏感基线

DOI 10.3969/j.issn.1008-7303.2010.02.09

中图分类号: S482.2 文献标志码: A 文章编号: 1008-7303(2010)02-0168-05

Effect of three carboxylic acid amide fungicides on different life stages of *Phytophthora melonis* and determination of the sensitivities

ZHU Shu-sheng^{1,2}, CHEN Lei¹, LU Xiao-hong¹, LI Jian-qiang¹, LIU Xi-li^{* 1}

(1 Department of Plant Pathology, College of Agronomy and Biotechnology,

China Agricultural University, Beijing 100193 China;

2 Key Laboratory of Agricultural Biodiversity for Plant Disease Management, Ministry of Education,

Key Laboratory of Plant pathology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract The effect of three carboxylic acid amide fungicides on different life stages of *Phytophthora melonis* was investigated. The results indicated that flumorph dinethomoph and iprovalicarb could effectively inhibit cystospore germination (with EC₅₀ values of 0.54, 0.46, 0.34 μg/mL, respectively), mycelial growth (with EC₅₀ values of 0.92, 0.70, 0.67 μg/mL, respectively) and sporangia production (with EC₅₀ values of 0.48, 0.31, 0.26 μg/mL, respectively) of *P.melonis*. But they had no effect on the zoospores release, zoospore motility and the formation of cystospore. The mean EC₅₀ values of flumorph dinethomoph and iprovalicarb to mycelium growth of *P.melonis* strains

收稿日期: 2010-01-13 修回日期: 2010-04-26

作者简介: 朱书生(1979-),男,云南人,博士后, E-mail: shushengzhu79@126.com; * 通讯作者(Author for correspondence): 刘西莉(1969-),女,陕西华县人,教授,主要从事杀菌剂药理学及病原菌抗药性的研究,电话(传真): 010-62731013 E-mail: seedling@cau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金(30671390, 30800731); “十一五”国家科技支撑计划项目(2006BAD08A03); 中国博士后科学基金(20090450482).

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

isolated from fields were 1.09(± 0.24), 0.29(± 0.04), and 0.32(± 0.07) $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. And the baseline sensitivities of the three fungicides were distributed as unimodal curves. No resistant subpopulation was detected among these strains.

Key words flumorph, dimethomorph, provalicarb; Phytophthora melonis; bioactivity, sensitivity baseline

黄瓜疫病(病原菌为 *Phytophthora melonis* Katsura)俗称“黄瓜瘟”,是黄瓜上的一种毁灭性的病害,在黄瓜产区普遍发生,且随着黄瓜栽培与重茬面积增加,发生日趋严重。目前,对黄瓜疫病的防治主要采用农业栽培管理措施、抗病品种、生物和化学防治等方法,其中化学防治是主要手段之一^[1-2]。生产上使用的主要杀菌剂为苯基酰胺类,如甲霜灵、苯霜灵和甲呋酰胺等^[3-4]。但随着这类杀菌剂的大量使用,许多病原菌对该类杀菌剂产生了严重的抗药性。因此,国际杀菌剂抗药性行动委员会(FRAC)已将该类药剂列为高抗药性风险的杀菌剂^[5]。评估和利用与其无交互抗药性的新型杀菌剂用于黄瓜疫病的防治和抗药性治理已势在必行。

羧酸酰胺类(Carboxylic acid amides, CAA s)杀菌剂是继苯基酰胺类杀菌剂之后,目前在生产上主要使用的一类防治卵菌病害的内吸性杀菌剂,其对植物卵菌病害具有优异的保护和治疗作用,且与苯基酰胺类杀菌剂无交互抗药性,目前已成为了世界各国农药公司研究的热点之一。近年来相继开发出了烯酰吗啉、氟吗啉和异丙菌胺等代表性药剂^[6-7]。FRAC将这类杀菌剂统称为羧酸酰胺类杀菌剂。

目前CAA类杀菌剂已经在国内外广泛用于马铃薯晚疫病,葡萄、黄瓜霜霉病,辣椒疫病等卵菌病害的防治,但在防治黄瓜疫病上的应用还未见报道。本研究旨在:1)探明氟吗啉、烯酰吗啉及异丙菌胺对黄瓜疫霉菌不同生长发育阶段的影响,以明确CAA类杀菌剂防治黄瓜疫病的最佳施用时期,为建立药剂混用、交替使用防治黄瓜疫霉病害的管理方案及指导田间科学有效地施药提供理论参考;2)明确黄瓜疫霉菌群体对氟吗啉、烯酰吗啉及异丙菌胺的敏感性分布,为进一步建立敏感基线,进行抗药性监测奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试药剂

96.8%氟吗啉(flumorph)原药,由沈阳化工研

究院提供;95.5%烯酰吗啉(dimethomoph)原药,由江苏耕耘农化有限公司提供;96%异丙菌胺(provalicarb)原药,购于Sigma公司;95%嘧菌酯(azoxystrobin)原药,由先正达公司(中国)提供。

1.2 供试菌株

108株黄瓜疫霉菌 *Phytophthora melonis* Katsura,自天津市黄瓜研究所、天津市西青区和河西区等未使用过CAA类杀菌剂的黄瓜大棚采集病样,室内采用常规的组织分离法分离,单孢纯化后培养于白云豆培养基平板上,用于测定敏感基线。从中随机选择一个菌株TJ58,用于测定杀菌剂对黄瓜疫霉菌不同发育阶段的影响。

1.3 供试杀菌剂对黄瓜疫霉菌不同发育阶段的抑制作用测定

1.3.1 孢子囊的产生及游动孢子悬浮液的制备

将供试菌株在白云豆培养基平板上于25℃±1℃下培养7d,沿菌落边缘打取直径5mm的菌饼,置于加有10mL无菌水的培养皿中,将培养皿置于28℃±1℃的光照条件下培养24h,以诱导其产生孢子囊。随后将其置于4℃冰箱,40~60min后取出,在室温下放置30~60min,待游动孢子释放。用两层纱布过滤,得到游动孢子悬浮液,用血球计数板测定并调整其浓度。

1.3.2 供试药剂对游动孢子游动的影响 参照Mitan等^[8]的方法。将配制好的游动孢子悬浮液和系列浓度药液各20μL,同时滴加到凹玻片上,在19℃黑暗条件下保湿培养,1h后在显微镜下观察游动孢子游动情况。以嘧菌酯为对照药剂。

1.3.3 对休止孢萌发的影响 参照朱书生等^[9]的方法。分别吸取40μL供试菌株的游动孢子悬浮液(每1mL含1×10⁵个孢子)和系列浓度的杀菌剂于洁净的凹玻片上,以等量无菌水为对照,混匀后于室温下放置2~4h,待对照休止孢萌发率超过80%时,在10×10倍显微镜下检测游动孢子休止孢的萌发数。每处理重复4次,每重复检测100个休止孢。计算各药剂对休止孢萌发的抑制率。

1.3.4 对孢子囊形成的影响 参照Matheron等^[10]的方法。将供试菌株接种在白云豆培养基上,

于 28 ℃ 下黑暗培养 4 d 用打孔器沿菌落边缘截取直径 5 mm 的菌饼, 挑出 5 块将其分散于含有 10 mL 系列质量浓度分别为 0.01, 0.05, 0.25, 0.50, 2.50 和 5.00 μg/mL 的培养皿中(直径 90 mm)。以含有无菌水的培养皿为对照。置于 28 ℃ 光照培养箱中连续光照 48 h 在 10×10 倍显微镜下检测孢子囊的数量。每菌饼随机检测 5 个视野, 每处理重复 4 次。计算各药剂对孢子囊形成的抑制率, 分析比较不同杀菌剂对供试病菌孢子囊形成的影响。

1.3.5 对游动孢子释放的影响 在 M itan 等^[8]方法基础上略加改进。由于黄瓜疫霉菌的孢子囊不易从菌丝上脱落, 因此直接在产生孢子囊的培养皿中加入系列浓度药液, 使其质量浓度分别为 0.01, 0.05, 0.25, 0.50, 2.50, 5.00 和 25.00 μg/mL, 在 19 ℃ 黑暗条件下保湿培养, 2 h 后在显微镜下观察空孢子囊的数量。每个浓度重复 4 次, 每重复计算 100 个孢子囊的空囊率。以能明显抑制游动孢子释放的杀菌剂嘧菌酯为对照药剂。

1.3.6 对菌丝生长的影响 参照尹敬芳等^[11]的方法。将供试杀菌剂配制成为系列梯度浓度的母液, 按体积比 1:100 的比例分别加入到已融化并冷却至 50 ℃ 左右的白云豆培养基中, 充分混匀后分别倒入 4 个灭菌的培养皿(直径 90 mm)中, 制成系列质量浓度(0.01, 0.05, 0.25, 0.50, 2.50, 5.00, 25.00 μg/mL)的含药培养基。以加入等体积有机溶剂的白云豆平板为对照。用打孔器(直径 5 mm)在供试菌株的菌落边缘打取菌饼, 菌丝面朝下接种于含药白云豆培养基平板中央, 置于 28 ℃ 恒温培养箱内黑暗培养, 4 d 后测量供试菌株在不同浓度含

药培养基上的菌落直径, 计算各药剂处理对菌落扩展的抑制率, 分析比较不同杀菌剂对供试病菌菌丝生长的影响。

1.4 黄瓜疫霉菌对 3 种杀菌剂的敏感性测定

采用菌丝生长抑制法测定氟吗啉、烯酰吗啉和异丙菌胺对黄瓜疫霉菌的毒力。参照 Brandt 等^[12]的方法, 采用 Excel 软件, 根据生物统计几率值换算表, 将抑制百分率换算成抑制几率值。以试验中设定的质量浓度对数为横坐标, 抑制几率值为纵坐标, 计算药剂的毒力回归方程、有效抑制中浓度 EC₅₀ 值。求出供试菌株的 EC₅₀ 值在不同浓度范围的频率, 建立黄瓜疫霉菌对 3 种杀菌剂的敏感性频率分布图。最后, 假定黄瓜疫霉菌对 3 种杀菌剂的敏感性符合正态分布, 利用 Excel 软件中的 NORMDIST 函数建立敏感性正态分布图, 并与实际敏感性频率分布图进行比较判断是否属于单峰曲线。

2 结果与分析

2.1 药剂对黄瓜疫霉菌游动孢子释放和游动的影响

试验结果表明, 氟吗啉、烯酰吗啉和异丙菌胺对黄瓜疫霉菌 TJ-58 菌株孢子囊释放游动孢子, 以及游动孢子的游动均没有明显的抑制作用(表 1)。当药剂质量浓度为 25 μg/mL 时, 对游动孢子释放的抑制率仅为 2%~7%, 对游动孢子的游动也无影响。而对照药剂嘧菌酯在 0.25 μg/mL 时, 对游动孢子释放的抑制率即可达 100%; 质量浓度为 0.05 μg/mL 时, 即可完全抑制游动孢子的游动。

表 1 氟吗啉、烯酰吗啉和异丙菌胺对黄瓜疫霉菌游动孢子释放和游动的影响

Table 1 Effect of flumorphdin in ethamophph and iprovalicarb on zoospore release and motility of P. melonis

质量浓度 Mass concentration / (μg/mL)	游动孢子释放比例 (%) / 对游动孢子释放的抑制率 (%) / 对游动孢子游动的抑制作用 ^a Percentage of zoospore release (%) / Rate of inhibition (%) / Inhibition of motility ^a			
	氟吗啉 flumorphdin	烯酰吗啉 ethamophph	异丙菌胺 iprovalicarb	嘧菌酯 azoxystrobin
0.00	100(±0)/- ^a	96(±2.6)/-	98(±2.3)/-	96(±1)/-
0.01	99(±1)/1/-	97(±2.5)/-1/-	94(±2.4)/-/-	75(±5)/22/+
0.05	98(±1)/2/-	95(±2.5)/1/-	95(±2.1)/3/-	12(±2.9)/87/+ +
0.25	100(±0)/0/-	96(±1.5)/0/-	97(±2.1)/1/-	0/100/+ +
0.50	99(±1.7)/1/-	100(±0)/-4/-	94(±0.6)/4/-	0/100/+ +
2.50	95(±2.5)/5/-	98(±2.1)/-2/-	93(±3.3)/5/-	0/100/+ +
5.00	98(±1.7)/2/-	96(±1.5)/0/-	98(±2.1)/0/-	0/100/+ +
25.00	94(±2.7)/6/-	94(±4.7)/2/-	91(±3.2)/7/-	0/100/+ +

^a + +, 所有游动孢子被抑制; +, 游动孢子部分被抑制; -, 游动孢子不被抑制。

2.2 对黄瓜疫霉菌休止孢萌发、菌丝生长和孢子囊形成的影响

试验结果表明,氟吗啉、烯酰吗啉和异丙菌胺对休止孢萌发、菌丝生长,尤其是对孢子囊的形成具有明显的抑制效果(表2)。其中对孢子囊形成的EC₅₀值分别为0.48、0.31和0.26 μg/mL;对休止孢

萌发的EC₅₀值分别为0.54、0.46和0.34 μg/mL;对菌丝生长的EC₅₀值分别为0.92、0.70和0.67 μg/mL。可见,异丙菌胺对黄瓜疫霉菌上述3个发育阶段的抑制活性均优于烯酰吗啉和氟吗啉。

表2 氟吗啉、烯酰吗啉和异丙菌胺对黄瓜疫霉菌孢子囊形成、休止孢萌发以及菌丝生长的抑制效果

Table 2 Inhibition of flumorph, dimethomorph and iprovalicarb on formation of sporangia, germination of cystospore and growth of mycelium of *P. meibn*

发育阶段 Life stage	杀菌剂 Fungicide	毒力回归方程 Regression equation $Y = Bx + A$	相关系数 R^2	抑制中浓度(95%置信限) $EC_{50} (95\% CL) / (\mu g/mL)$
孢子囊形成 Sporangia production	氟吗啉 flumorph	$Y = 0.9481x + 5.2975$	0.9705	0.48(0.33~0.71)
	烯酰吗啉 dimethomorph	$Y = 0.7738x + 5.3902$	0.9912	0.31(0.26~0.38)
	异丙菌胺 iprovalicarb	$Y = 0.8370x + 5.4913$	0.9809	0.26(0.19~0.35)
休止孢萌发 Germination of cystospore	氟吗啉 flumorph	$Y = 0.8875x + 5.2325$	0.9868	0.54(0.42~0.70)
	烯酰吗啉 dimethomorph	$Y = 0.8909x + 5.2921$	0.9276	0.46(0.26~0.85)
	异丙菌胺 iprovalicarb	$Y = 0.7959x + 5.3814$	0.9844	0.34(0.25~0.43)
菌丝生长 Mycelia growth	氟吗啉 flumorph	$Y = 0.964x + 5.0454$	0.9491	0.92(0.52~1.55)
	烯酰吗啉 dimethomorph	$Y = 0.7774x + 5.1237$	0.9817	0.70(0.51~0.94)
	异丙菌胺 iprovalicarb	$Y = 0.8305x + 5.1436$	0.9575	0.67(0.42~1.07)

2.3 黄瓜疫霉菌对氟吗啉、烯酰吗啉和异丙菌胺的敏感性频率分布

采用菌落直径法,测定了108株黄瓜疫霉菌对氟吗啉的敏感性,其中EC₅₀值最大为1.84 μg/mL,最小为0.53 μg/mL,相差2.47倍,平均EC₅₀值为1.09(±0.24) μg/mL。35株黄瓜疫霉菌对烯酰吗啉的敏感性测定结果表明,EC₅₀值最大为0.37 μg/mL,最小为0.17 μg/mL,相差1.18倍,平均EC₅₀值为0.29(±0.04) μg/mL。29株黄瓜疫霉菌对异丙菌胺也表现出较高的敏感性,其中EC₅₀值最大为0.48 μg/mL,最小为0.15 μg/mL,相差2.2倍,平均EC₅₀值为0.32(±0.07) μg/mL。

从敏感性频率分布图(图1A, B, C)可以看出,供试黄瓜疫霉菌对氟吗啉、烯酰吗啉和异丙菌胺的敏感性分布呈连续性。敏感性频率分布为近似正态分布的单峰曲线,说明供试菌株中没有出现敏感性下降的群体。

3 讨论

本研究结果表明,氟吗啉、烯酰吗啉和异丙菌胺对黄瓜疫霉菌具有相似的抑菌特性,即对游动孢子的释放及游动均无抑制作用,但对休止孢的萌

发、菌丝生长和孢子囊的形成阶段具有明显的抑制效果。该结果与CAA类杀菌剂对黄瓜霜霉病菌和马铃薯晚疫病菌不同生长发育阶段的抑制作用相似^[9, 13~18]。3种杀菌剂对孢子囊形成阶段的抑制效果最显著,对休止孢萌发和菌丝生长的抑制作用次之,表明3种杀菌剂对黄瓜疫霉病具有保护和治疗作用,在病害发生的不同阶段均可使用这类杀菌剂进行防治,尤其可通过在孢子囊产生阶段施用药物,以有效抑制病原菌的再侵染及病害的发展蔓延。

敏感性频率分布情况表明,供试菌株对这3种杀菌剂的敏感性呈正态分布,未检测到有敏感性明显分化的群体存在。该结果能反映出田间自然情况下病原菌对CAA类杀菌剂的敏感性特征。比较上述研究结果和已经报道的其他卵菌对CAA类杀菌剂的敏感基线的研究结果^[19~20]可知,黄瓜疫霉菌对烯酰吗啉和氟吗啉的敏感性低于黄瓜霜霉、致病疫霉和辣椒疫霉,这可能与不同病原菌中靶标的结构特点等有关。因此,建议在黄瓜疫病的防治中有有效施药量的确定需高于其他病害,以便于更有效地控制该病的发生和蔓延,避免低浓度选择压下因药剂驯化作用而导致病原菌抗药性的产生和发展,但具体研究和验证还有待在田间条件下实施。

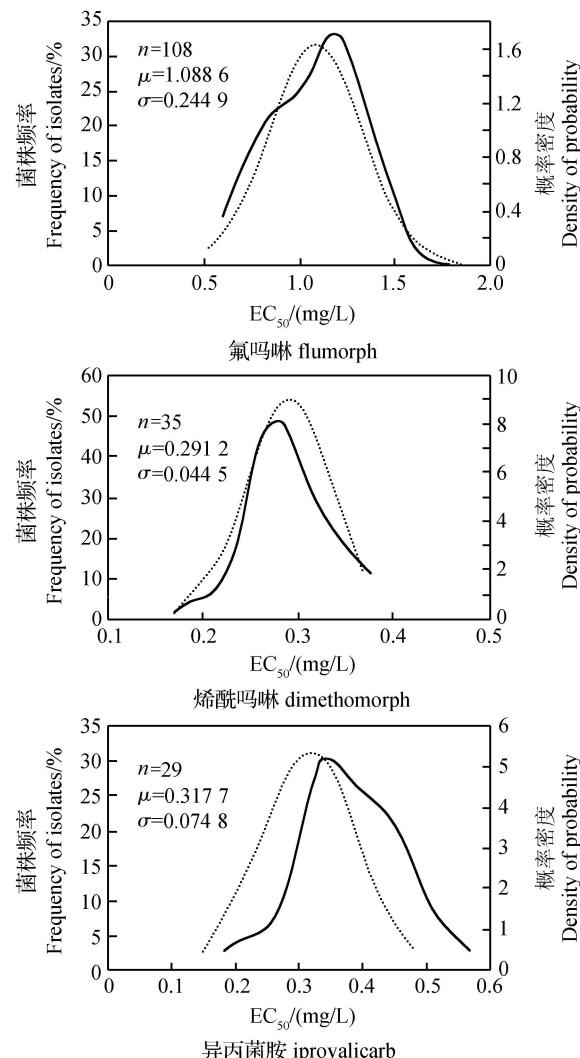


图 1 黄瓜疫霉病菌对氟吗啉(A)、烯酰吗啉(B)和异丙菌胺(C)的敏感性频率分布

Fig 1 Distribution of EC₅₀ values of flumorph (A), dimethomorph (B) and iprovalicarb (C) against *P. melonis* populations

图中实线为病原菌对杀菌剂实际的敏感性频率分布;
虚线为假定供试菌株对杀菌剂的敏感性频率分布。
分布符合正态分布的分布图。

Real line shows the real distribution of strains to fungicides
broken line indicates that the distribution of all strains
to fungicides accord with normal distribution.

参考文献:

- [1] LIN Ming-bao(林明宝), FANG He-ren(方禾壬). 黄瓜疫病抗性遗传研究 [J]. J South China Agric Univ(华南农业大学学报), 2000, 21(1): 13-15
- [2] GAO Xiang-yang(高向阳), LIN Bi-nun(林碧润), YAO Ru-hua(姚汝华), et al. 新抗生素万隆霉素对黄瓜疫病菌抑菌形态学研究 [J]. J South China Agric Univ(华南农业大学学报), 2004, 25(4): 27-29.
- [3] CHEUNG Jia-zhuang(成家壮). 甲霜灵防治黄瓜疫病、霜霉病及猝倒病试验 [J]. Pesticides(农药), 1992, 31(2): 49-50, 35.
- [4] YI Tu-yong(易图永), WU Li-you(吴力游), ZHU Xiao-xiang(朱晓湘). 防治黄瓜疫病的药剂筛选 [J]. J Hunan Agric Univ(湖南农业大学学报), 1998, 24(1): 47-51
- [5] FRAC. CAA working group reports [EB/OL]. (2005). <http://www.frac.info>
- [6] LIU Wu-cheng(刘武成), LIU Chang-ling(刘长令). 新型高效杀菌剂氟吗啉 [J]. J Pestic (农药), 2001, 41: 8-11
- [7] DUTZMANN S. Iprovalicarb (SZX 0722): a novel fungicide with specific activity against oomycetes [J]. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer, 1999, 52(1): 15-32
- [8] MIFANIS ARAKIS YAMAGUCHIT, et al. Antifungal activity of the novel fungicide cyazofamid against *Phytophthora* infestans and other plant pathogenic fungi in vitro [J]. Pestic Biochem Physiol, 2001, 70: 92-99
- [9] ZHU Shu-sheng(朱书生), YUAN Shan-ku(袁善奎), FAN Jie-nu(范洁茹). 六种杀菌剂对黄瓜霜霉病菌不同发育阶段的影响 [J]. Chin J Pestic Sci(农药学学报), 2005, 7(2): 119-125
- [10] MATHERON M E, PORCHAS M. Impact of azoxystrobin dimethomorph, flutriafol, fosetyl-A and metalaxyl on growth sporation, and zoospore cyst germination of three *Phytophthora* spp [J]. Plant Disease, 2000, 84: 454-458
- [11] YIN Jing-fang(尹敬芳), CAO Jin(曹锦), LI Jian-qiang(李健强), et al. 杀菌剂对辣椒疫霉不同形态菌体的毒力差异 [J]. Chin J Pestic Sci(农药学学报), 2005, 7: 227-232
- [12] BRANDT U, SCHAGGER H, JAGOW V G. Characterization of binding of the methoxyacrylate inhibitors to mitochondrial cytochrome c reductase [J]. Euro J Biochem, 1988, 173: 499-506.
- [13] YUAN Shan-ku(袁善奎), LIU Xili(刘西莉), LIU Liang(刘亮), et al. 马铃薯晚疫病菌对烯酰吗啉的敏感性基线及其室内抗药性突变体的研究 [J]. Acta Phytopath Sin(植物病理学报), 2005, 35(6): 545-551.
- [14] COHEN Y, BAIDER A, COHEN B. Dimethomorph activity against oomycete fungal plant pathogens [J]. Phytopathology, 1995, 85: 1500-1506
- [15] JENDE G. The cell wall of the oomycete *Phytophthora* infestans as a target of fungicides [D]. Bonn Germany: Bonn University, 2001
- [16] REUVENIM. Activity of the new fungicide benthiavalicarb against *Plasmopara vitivora* and its efficacy in controlling downy mildew in grapevines [J]. Euro J Plant Path, 2003, 109: 243-251
- [17] MIYAKE Y, SAKAI J, SHIBATA M, et al. Fungicidal activity of benthiavalicarb-isopropyl against *Phytophthora* infestans and its controlling activity against late blight diseases [J]. J Pestic Sci, 2005, 30: 390-396
- [18] HUGGENBERGER E, LAMBERTH C, WANZIK W. M and ipronalid: a new fungicide against oomycete pathogens [C] // Proceedings of the BCPC International Congress Glasgow, UK, 2005: 87-92
- [19] YUAN S K, LIU X L, GU B G, et al. Induction and characterization of laboratory mutants of *Phytophthora capsici* resistant to DMH and flumorph [J]. Agricultural Sciences in China, 2005, 4: 101-105.
- [20] ZHU S S, LIU X L, LIU P F, et al. Resistance risk of *Pseudoperonospora cubensis* to flumorph in cucumber plastic houses [J]. Plant Pathology, 2007, 56: 967-975

(责任编辑:金淑惠)