

广西烟草黑胫病菌对甲霜灵的敏感性检测

朱桂宁¹, 贤小勇¹, 黄福新¹, 秦碧霞¹, 周兴华², 李其星³, 韦学平⁴, 冉德辉⁵, 林珊宇¹
(¹广西农业科学院植物保护研究所, 南宁 530007; ²广西烟草专卖局烟叶管理处, 南宁 530023; ³广西烟草公司德保分公司, 广西德保 533700; ⁴广西烟草公司百色市烟草科研所, 广西百色 533800; ⁵广西烟草公司隆林分公司, 广西隆林 533400)

摘要:【目的】研究广西烟草黑胫病菌对甲霜灵的敏感性,为烟草黑胫病药剂防治提供科学依据。【方法】采用菌落生长速率法对从广西主要烟区采集分离到的196株烟草黑胫病菌株进行对甲霜灵的敏感性测定。【结果】甲霜灵对196株菌株的 EC_{50} 在0.0691~1.0243 $\mu\text{g/mL}$,平均 EC_{50} 为 $0.3618\pm 0.0297 \mu\text{g/mL}$;来自田林县的菌株TL05为最敏感菌株, EC_{50} 为0.0691 $\mu\text{g/mL}$;来自靖西县画洞镇的菌株ZXHD12为最耐药菌株, EC_{50} 为1.0243 $\mu\text{g/mL}$;各烟区烟草黑胫病菌对甲霜灵的敏感性有一定差异,其中南丹、田林县的菌株较敏感,而隆林、靖西、德保、富川县的部分菌株较耐药;196株菌株中,敏感型、一般耐药型和耐药型菌株分别占1.53%、66.84%和31.63%。【结论】广西烟草黑胫病菌已对甲霜灵产生不同程度的抗性,甲霜灵作为生产上防治烟草黑胫病的主要药剂具有较大的风险,建议生产上甲霜灵与其他杀菌剂进行轮换使用。

关键词:烟草黑胫病菌; 甲霜灵; 敏感性; 广西

中图分类号:S435.72

文献标识码:A

文章编号:2095-1191(2011)06-0623-04

Detection of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* sensitivity to metalaxyl in Guangxi

ZHU Gui-ning¹, XIAN Xiao-yong¹, HUANG Fu-xin¹, QIN Bi-xia¹, ZHOU Xing-hua², LI Qi-xing³, WEI Xue-ping⁴, RAN De-hui⁵, LIN Shan-yu¹

(¹ Plant Protection Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China; ² Tobacco Leaf Administration of Guangxi Tobacco Monopoly Bureau, Nanning 530023, China; ³ Debao Branch Company of Guangxi Tobacco Corporation, Debao, Guangxi 533700, China; ⁴ Research Institute of Baise Tobacco Corporation, Guangxi Tobacco Corporation, Baise, Guangxi 533800, China; ⁵ Longlin Branch Company of Guangxi Tobacco Corporation, Longlin, Guangxi 533400, China)

Abstract: 【Objective】The present experiment was conducted to study the sensitivity of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* to metalaxyl in Guangxi in order to apply the proper control measures for its spread. 【Method】Sensitivity of 196 *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* strains isolated from the main tobacco areas of Guangxi to metalaxyl was tested by observing the growth rate of fungal strains. 【Result】 EC_{50} values of 196 isolates ranged from 0.0691 to 1.0243 $\mu\text{g/mL}$, and the mean EC_{50} value was $0.3618\pm 0.0297 \mu\text{g/mL}$. The isolate TL05 from Tianlin County was the most sensitive one, with the EC_{50} value of 0.0691 $\mu\text{g/mL}$, while the isolate ZXHD12 from Huadong Town, Jingxi County was the most resistant, with the EC_{50} value of 1.0243 $\mu\text{g/mL}$. A significant difference among the sensitivities of isolates from different sites has been observed. The isolates from Nandan and Tianlin County were the most sensitive, while those from Longlin, Jingxi, Debao and Fuchuan County were the most resistant. The frequencies of sensitive, intermediate and resistant isolates to metalaxyl were 1.53, 66.84 and 31.63%, respectively. 【Conclusion】A low level of resistance to metalaxyl has been observed in *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* in Guangxi. It is, therefore, suggested that metalaxyl should be alternated with other fungicides for proper control of the tobacco black shank.

Key words: *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*; metalaxyl; sensitivity; Guangxi

0 引言

【研究意义】由疫霉属烟草疫霉 (*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*)引起的烟草黑胫病是世界烟草生产中危害最严重的病害之一,也是我国烟草的主要病害(陈瑞泰等,1997;黄宁珍等,2010;梁宏合,2010)。化学防治是烟草黑胫病综合防治中的重要手

段(李斌等,2008)。甲霜灵属苯酰胺类内吸性杀菌剂,由于甲霜灵在内吸性、生物活性和持效期等方面均优于同类化合物,已被广泛应用于防治烟草黑胫病。随着甲霜灵在生产上的普遍使用,病菌的抗药性问题接踵而至(马国胜等,2004)。【前人研究进展】Shew(1985)研究发现,连年施用甲霜灵后,烟草黑胫

收稿日期:2011-03-08

基金项目:广西烟草专卖局科技发展基金项目(桂烟科2008-1)

作者简介:朱桂宁(1968-),女,广西武宣人,硕士,副研究员,主要从事植物病理学及杀菌剂抗药性研究工作

病菌的平均半致死浓度(EC_{50})呈上升趋势。王革等(1997)于1994~1995年检测了烟草黑胫病菌对甲霜灵的抗药性,结果发现,分离自云南省烟草黑胫病病株的95株烟草疫霉菌菌株的 EC_{50} 平均为0.0325 $\mu\text{g/mL}$,未检测到对甲霜灵具抗性的菌株。袁宗胜等(2001)和马国胜(2002)研究表明,黑胫病菌群已对以甲霜灵为代表的苯基酰胺类杀菌剂产生明显抗性。李梅云和祝明亮(2006)于2004年检测了云南省烟草黑胫病菌菌株对甲霜灵的抗药性,34个菌株的 EC_{50} 平均为0.0148 $\mu\text{g/mL}$,范围在0~0.053 $\mu\text{g/mL}$ 。许学明等(2007,2008)测定了来自云南、贵州、山东的38个烟草黑胫病菌菌株对甲霜灵的敏感性,结果38个参试菌株的 EC_{50} 分布在0.0867~1.6781 $\mu\text{g/mL}$,均值为0.2991 \pm 0.0843 $\mu\text{g/mL}$,认为38个参试菌株对甲霜灵的抗性均处在较低水平;研究还表明,在一定的选择压力或逆境中烟草黑胫病菌容易对甲霜灵产生抗性,其抗性频率可以随着药剂选择压力的加大而不断提高,具有累加效应。【本研究切入点】广西烟草黑胫病发生严重,甲霜灵作为主要的防治药剂已使用20多年,近年来不少烟农反映该药剂的防效不理想,因此生产上急需明确广西田间是否已出现抗甲霜灵菌株,了解广西烟草黑胫病菌对甲霜灵的敏感水平。【拟解决的关键问题】于2008~2010年广泛采集分离自广西各烟区的烟草黑胫病菌,检测它们对甲霜灵的敏感性,明确广西是否已产生抗药菌株及其抗性菌株的抗药水平,以期烟草黑胫病的药剂防治提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株的采集和分离

2008~2010年,分别到广西德保、靖西、那坡、隆林、田林、富川、钟山、罗城、南丹和凌云等10个主要烟草种植区内,每隔一段距离随机采集烟草黑胫病典型病株,将病株茎秆带回实验室进行分离。在含有利福平20 $\mu\text{g/mL}$ 、氨苄青霉素200 $\mu\text{g/mL}$ 的燕麦选择性培养基上进行病原菌分离:先将病茎洗净晾干,切成小段后用75%的酒精消毒1 min,切开病茎,用镊子小心撕取一小片病茎中的碟片状髓部组织,接种于培养基上,28℃培养2~3 d,按田苗英等(2000)的方法进行菌株纯化,纯化后的菌株在燕麦培养基上培养5~7 d后直接进行甲霜灵敏感性测定。

1.2 试验药剂及含药培养基的制备

95.4%甲霜灵原药由江苏宝灵化工股份有限公司提供。采用菌落生长速率法进行测定。抗性测定时,甲霜灵原药先用丙酮溶解,再用灭菌蒸馏水配成

系列不同的浓度(0.001、0.05、0.10、0.25、0.50、1.00、2.50、5.00 $\mu\text{g/mL}$),并使各浓度中所含丙酮的量一致,然后分别加入溶化后冷却至50℃左右的100 mL燕麦培养基中,摇匀后倒入直径9 cm的灭菌培养皿,即制成不同浓度的系列含药培养基平板。

1.3 烟草黑胫病菌对甲霜灵敏感性测定

对在燕麦培养基上培养了5~7 d的菌株,用打孔器于菌落边缘处均匀打取直径为5 mm的菌饼,将其接种于含有甲霜灵系列浓度的燕麦培养基平板上,每皿1片,置于28℃恒温箱内培养,每个浓度处理重复3次。当对照(即不含杀菌剂的培养基平板)的菌落直径达5 cm以上时,用垂直十字交叉法测量菌落直径,计算抑制率,求出各菌株的毒力回归方程、相关系数和 EC_{50} 。按袁宗胜等(2001)的方法将菌株分为甲霜灵敏感型菌株(MS, $EC_{50}<0.1$ $\mu\text{g/mL}$)、一般耐药型菌株(MI, EC_{50} 在0.1001~0.4001 $\mu\text{g/mL}$)和耐药型菌株(MR, $EC_{50}>0.4001$ $\mu\text{g/mL}$)。

2 结果与分析

2.1 烟草黑胫病菌菌株的采集与分离

2008~2010年,在广西10个主产烟区中,除那坡、罗城和凌云县未采集到病害标样外,其余烟区均采集到病害标样,利用选择性培养基进行病原菌分离与纯化,共获得纯菌株196株。

2.2 烟草黑胫病菌对甲霜灵的敏感性测定结果

测定结果表明,甲霜灵对广西196株测试菌株的 EC_{50} 在0.0691~1.0243 $\mu\text{g/mL}$,平均为0.3618 \pm 0.0297 $\mu\text{g/mL}$ 。来自田林县的菌株TL05为最敏感菌株,其 EC_{50} 为0.0691 $\mu\text{g/mL}$,而来自靖西县画洞镇的菌株ZX-HD12的 EC_{50} (1.0243 $\mu\text{g/mL}$)最大,最耐药菌株的 EC_{50} 是最敏感菌株的14.82倍。各烟区黑胫病菌对甲霜灵的敏感性有一定差异,其中南丹县、田林县的菌株较敏感,而隆林县、靖西县、德保县、富川县的部分菌株较耐药。按袁宗胜等(2001)的划分方法,广西的196株菌株中,只有3株(1株来自田林县,另2株来自南丹县)属于敏感型菌株,占测定总数的1.53%;131株属一般耐药型菌株,占测定总数的66.84%;62株属耐药型菌株,占测定总数的31.63%(表1、表2)。

从196株菌株的 EC_{50} 分布图(图1)可以看出,黑胫病菌对甲霜灵的敏感性呈单峰曲线,接近正态分布,表明目前烟草黑胫病菌对甲霜灵的抗性尚处在较低水平,没有出现抗性上升的抗药性亚群体。绝大部分菌株(195/196)的 $EC_{50}\leq 1.0000$ $\mu\text{g/mL}$ 。

表 1 广西部分烟草黑胫病菌株对甲霜灵的敏感水平

Table 1 Sensitivity level of some *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* isolates to metalaxyl

菌株 Strain	地点 Site	毒力回归方程 Regression equation	相关系数(r) Correlation coefficient	EC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
FCML01	富川县	y=6.2079+1.6760x	0.9951	0.1082
FCML02	富川县	y=6.8917+2.1396x	0.9926	0.1306
FCML03	富川县	y=6.2079+1.6760x	0.9929	0.1903
FCML04	富川县	y=6.5780+2.0268x	0.9877	0.1665
FCML09	富川县	y=6.2682+1.4032x	0.9936	0.1248
FCMJ01	富川县	y=5.0641+1.3067x	0.9870	0.8931
FCMJ07	富川县	y=5.8801+1.5614x	0.9911	0.2731
FCHD09	富川县	y=6.2805+1.9040x	0.9913	0.2126
FCMJ04	富川县	y=5.1404+1.0807x	0.9943	0.7415
FCGP01	富川县	y=5.5753+1.2977x	0.9912	0.3603
FCGP05	富川县	y=5.5329+1.2687x	0.9940	0.3801
FCFY04	富川县	y=7.1222+2.1667x	0.9900	0.1048
DBDA02	德保县	y=6.0125+1.3904x	0.9982	0.1870
DBDA10	德保县	y=5.4172+1.0266x	0.9815	0.3924
DBDA15	德保县	y=5.9016+1.2328x	0.9875	0.1856
DBDA19	德保县	y=5.5702+1.1301x	0.9837	0.3128
DBZY02	德保县	y=5.4092+1.0868x	0.9787	0.4202
DBZY14	德保县	y=5.7014+1.0892x	0.9892	0.2270
DBZY05	德保县	y=5.9233+1.4951x	0.9875	0.2412
DBZY07	德保县	y=5.0525+1.2138x	0.9875	0.9054
DBYD13	德保县	y=6.4290+1.6625x	0.9951	0.1382
ZXHD09	靖西县	y=5.1348+1.2520x	0.9896	0.7804
ZXHD12	靖西县	y=4.9880+1.1473x	0.9932	1.0243
ZXPD05	靖西县	y=5.5489+1.3299x	0.9941	0.3866
ZXPD06	靖西县	y=5.4593+1.2187x	0.9856	0.4199
ZXPD10	靖西县	y=5.7276+1.5698x	0.9904	0.3439
ZXXX01	靖西县	y=6.4105+1.4120x	0.9907	0.1002
ZXXX07	靖西县	y=6.0632+1.5838x	0.9929	0.2132
ZXXX09	靖西县	y=6.3684+1.6874x	0.9892	0.1546
ZXXX21	靖西县	y=5.8367+1.1878x	0.9972	0.1975
LLKC04	隆林县	y=5.6965+1.4344x	0.9853	0.3270
LLYC02	隆林县	y=5.5429+1.2360x	0.9903	0.3637
LLYC05	隆林县	y=5.3696+1.2370x	0.9858	0.5026
LLYC06	隆林县	y=5.1255+0.9521x	0.9444	0.7381
LLLH02	隆林县	y=5.1402+0.9565x	0.9884	0.7135
LLLH11	隆林县	y=5.1599+0.9792x	0.9950	0.6866
NDLZ01	南丹县	y=6.1072+1.4051x	0.9836	0.1630
NDLZ02	南丹县	y=6.4242+1.8185x	0.9850	0.1647
NDLZ03	南丹县	y=6.3913+1.7140x	0.9860	0.1543
NDLZ06	南丹县	y=6.4734+1.2877x	0.9920	0.0717
NDLZ10	南丹县	y=6.4294+1.3771x	0.9957	0.0916
ZSGA03	钟山县	y=5.7776+1.6504x	0.9903	0.3379
ZSGA04	钟山县	y=5.3910+1.0065x	0.9961	0.4088
ZSGA06	钟山县	y=6.4401+1.8512x	0.9966	0.1668
TL03	田林县	y=5.7725+1.4162x	0.9909	0.2848
TL05	田林县	y=6.4592+1.2577x	0.9934	0.0691

表 2 2008~2010年广西各烟区黑胫病菌对甲霜灵的敏感性
Table 2 Sensitivities of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* to metalaxyl in Guangxi during 2008–2010

地点 Site	菌株数 No. of strain	敏感型 Metalaxyl sensitive		一般耐药型 Intermediate metalaxyl sensitive		耐药型 Metalaxyl resistant	
		菌株数 No.	所占比例 (%) Frequency	菌株数 No.	所占比例 (%) Frequency	菌株数 No.	所占比例 (%) Frequency
富川县 Fuchuan County	50	0	0.00	38	76.00	12	24.00
钟山县 Zhongshan County	6	0	0.00	4	66.67	2	33.33
靖西县 Jingxi County	45	0	0.00	26	57.78	19	42.22
德保县 Debao County	48	0	0.00	32	66.67	16	33.33
隆林县 Longlin County	30	0	0.00	17	56.67	13	43.33
田林县 Tianlin County	6	1	16.67	5	83.33	0	0.00
南丹县 Nandan County	11	2	18.18	9	81.82	0	0.00
合计 Total	196	3	1.53	131	66.84	62	31.63

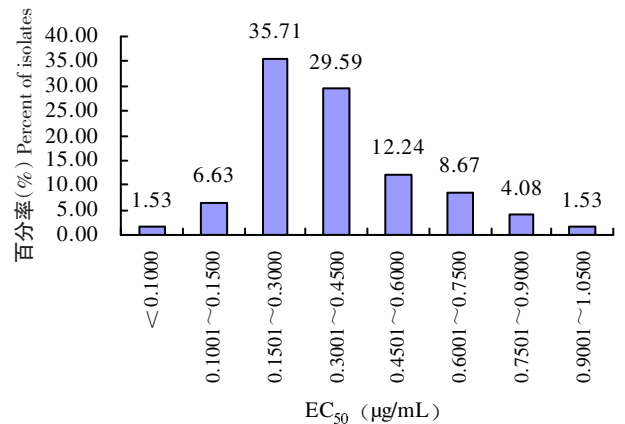


图 1 广西烟草黑胫病菌对甲霜灵的敏感性分布

Fig.1 Distribution of the sensitivity of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* strain to metalaxyl in Guangxi

3 讨论

研究表明,来自广西不同烟区的196株烟草黑胫病菌株对甲霜灵的敏感性存在一定差异,这与不同烟区黑胫病的发生情况不同、甲霜灵被用来防治黑胫病的频率不同有关。靖西、隆林、富川等烟区历年烟草黑胫病发生均比较严重,甲霜灵使用的年份久、每年使用的次数也较多,因而来自这些烟区的烟草黑胫

病菌株对甲霜灵的敏感性下降;田林、南丹烟区烟草黑胫病仅为零星发生,甲霜灵的使用频率较低,因而来自这两个烟区的黑胫病菌株对甲霜灵较敏感,这两个烟区均未分离到甲霜灵耐药型菌株。本研究检测的196株菌株的平均EC₅₀为0.3618±0.0297 $\mu\text{g/mL}$,明显高于王革等(1997)、李梅云和祝明亮(2006)等的检测结果,而与许学明(2007)的检测结果比较接近。

4 结论

来自广西主要烟区的196株烟草黑胫病菌株对甲霜灵的敏感性检测结果表明,敏感型菌株仅占测定菌株的1.53%,绝大部分菌株为甲霜灵一般耐药型或耐药型菌株,表明广西烟草黑胫病菌对甲霜灵已产生了不同程度的耐药性,甲霜灵作为生产上防治烟草黑胫病的主要药剂具有较大的风险性。笔者于2008~2010年进行的田间烟草黑胫病防治试验也表明,以甲霜灵为代表的苯基酰胺类杀菌剂的防治效果已偏低(另文报导),建议生产上及时与银法利、烯酰吗啉、霜脲氰等杀菌剂进行轮换使用。

参考文献:

- 陈瑞泰,朱贤朝,王智发,郭振业,董汉松,王兰珍,刘延荣,石金开. 1997. 我国16个主产烟省(区)烟草侵染性病害调研报告[J]. 中国烟草科学,(4):1-7.
- 黄宁珍,区婵,何金祥,赵志国,王新桂,郭伦发,周浩,龚庆芳. 2010. 广西岩溶区烟草黑胫病拮抗细菌的筛选鉴定及其抗病机理[J]. 广西植物,30(6):869-875.
- 李斌,龚国淑,姚革,杨益芬,钱宇. 2008. 烟草黑胫病化学防治研究进展[J]. 广西农业科学,39(3):331-334.
- 李梅云,祝明亮. 2006. 烟草黑胫病菌对甲霜灵的抗性测定[J]. 中国农学通报,22(9):377-379.
- 梁宏合. 2010. 烟草疫霉毒素的产生及生物测定初报[J]. 广西热带农业,(5):25-29.
- 马国胜. 2002. 烟草黑胫病菌生理生态及对甲霜灵抗性监测与遗传研究[D]. 合肥:安徽农业大学:86-87.
- 马国胜,高智谋,陈娟. 2004. 烟草黑胫病菌研究进展(Ⅲ)[J]. 烟草科技,(2):44-48.
- 田苗英,冯兰香,龚会芝,杨翠荣. 2000. 番茄晚疫病菌的分离与纯化[J]. 植物保护,26(5):36.
- 王革,郑小波,陆家云,李天飞. 1997. 云南省烟草黑胫病菌对甲霜灵抗性的检测[J]. 南京农业大学学报,20(4):105-107.
- 许学明. 2007. 烟草黑胫病菌对6种杀菌剂的抗性测定及抗甲霜灵机制的初步研究[D]. 泰安:山东农业大学:54-57.
- 许学明,王开运,段海明,林才华,张文成. 2008. 烟草黑胫病菌抗甲霜灵突变体的诱导及其适合度研究[J]. 农药学报,10(1):35-40.
- 袁宗胜,张广民,刘延荣,陈松涛. 2001. 烟草黑胫病菌对甲霜灵的敏感性测定[J]. 中国烟草科学,(4):9-12.
- Shew H D. 1985. Response of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* to metalaxyl exposure[J]. Plant Disease,69:559-562.

(责任编辑 麻小燕)