

大豆疫霉菌 (*Phytophthora sojae*) 抗甲霜灵菌株筛选及生物学特性

国莉玲¹, 左豫虎^{1*}, 柯希望¹, 王晓杰², 韩德俊², 韩青梅², 康振生², 黄丽丽²

(1. 黑龙江八一农垦大学农学院, 黑龙江 大庆, 163319;

2. 旱区作物逆境生物学国家重点实验室/西北农林科技大学, 陕西 杨凌, 712100)

摘要:以大豆疫霉野生菌株 Pmg1 为亲本, 采用药剂驯化法获得抗甲霜灵菌株。初步研究抗药菌株的抗性水平、菌丝生长阶段抗性的稳定性、菌落生长速率、菌落形态、游动孢子囊和卵孢子产生能力等生物学特性, 并利用光学显微镜观察其菌丝、游动孢子囊和卵孢子的形态。结果表明, 获得 5 株抗甲霜灵菌株 Pmg1 – Mt^r1、Pmg1 – Mt^r2、Pmg1 – Mt^r3、Pmg1 – Mt^r4、Pmg1 – Mt^r5, 抗性水平分别可达到野生亲本的 3 793.7、5 581.7、5 773.9、4 409.3 和 5 476.0 倍, 且抗性可在菌丝阶段稳定遗传。与野生菌株 Pmg1 相比, 抗药菌株的菌落生长速率明显降低; 菌丝、游动孢子囊和卵孢子在形态上与野生菌株相比没有明显变化, 但抗药菌株游动孢子囊和卵孢子的产量显著降低。表明大豆疫霉菌对甲霜灵容易产生抗性, 抗药菌株在菌丝阶段抗药性的保持对甲霜灵没有依赖性。菌株除抗药性提高、游动孢子囊和卵孢子产生能力下降外, 其它生物学性状没有发生显著变化。

关键词:大豆疫霉菌; 甲霜灵; 抗性诱导; 药剂驯化; 抗药稳定性; 生物学特性

中图分类号: S435.651

文献标识码: A

文章编号: 1007 – 9084(2014)05 – 0623 – 07

Screening and biological characteristics of metalaxyl – resistant isolates of *Phytophthora sojae*

GUO Li – ling¹, ZUO Yu – hu^{1*}, KE Xi – wang¹, WANG Xiao – jie²,

HAN De – jun², HAN Qing – mei², KANG Zhen – sheng², HUANG Li – li²

(1. College of Agronomy, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China;

2. State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas /Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: To understand the characteristics of metalaxyl – resistant strain of *Phytophthora sojae*, metalaxyl – resistant (Mt^r) isolates were obtained by chemical taming from wild – type parent isolate Pmg1. The investigated biological characteristics included resistance level, stability of resistance in the growth of hyphae, colony growth rate and morphology, production capability of zoosporangium and oospores. Morphology of hyphae, zoosporangium and oospores were also observed under optical microscope. Results showed that the resistance levels of Mt^r isolates were 3 793.7, 5 581.7, 5 773.9, 4 409.3 and 5 476.0 folds of wild – type parent respectively, and the resistance were stably inherited during hyphae growth stage. Compared with wild – type parent Pmg1, Mt^r isolates colony growth reduced. The morphology of hyphae, zoosporangium and oospores had no significant differences from those of wild – type parent, but zoosporangium and oospores production decreased significantly. The result indicated that it was easy for *P. sojae* to produce resistance to metalaxyl, and the resistance of Mt^r isolates could remain in hyphae growth stage without metalaxyl. The resistance of Mt^r isolates was increased and the production capability of zoosporangium and oospores was decreased, other biological characteristics had no significant change.

Key words: *Phytophthora sojae*; Metalaxyl; Inducible resistance; Chemical taming; Stability of resistance; Biological characteristics

大豆疫霉根腐病 (*Phytophthora root rot*), 又名大豆疫病, 是由大豆疫霉 (*Phytophthora sojae* Kaufmann et Gerdemann) 侵染引起的大豆毁灭性病害之一。该病菌对大豆的寄生专化性强, 侵染大豆后, 引起幼苗和成株的根腐或茎腐, 对大豆生产构成很大威胁。在全世界范围内, 每年造成的大豆生产直接经济损失高达十几亿美元^[1]。目前, 我国已发现在黑龙江、吉林、福建、安徽、北京、内蒙古、江苏、河南、山东、浙江和湖北等十多个省市^[2~7] 都有分布, 其中在黑龙江和福建发生严重, 已成为当地大豆的重要病害^[1,8]。

目前国内外报道防治大豆疫霉根腐病的杀菌剂中, 最有效的是以甲霜灵 [N - (2,6 - dimethylphenyl) - N - methoxyacetyl alanine] 为代表的苯酰胺类杀菌剂^[9,10], 但由于甲霜灵属于特异性位点抑制剂, 作用位点单一, 病菌易对其产生抗性突变^[10~13]。前人研究表明, 虽然不同疫霉菌或不同研究结果存在差异, 但均说明了长期单一使用甲霜灵会使病原菌对甲霜灵产生抗药性, 例如致病疫霉 (*P. infestans*)、烟草疫霉 (*P. nicotianae*)、苎麻疫霉 (*P. boehmeriae*)、大豆疫霉 (*P. sojae*) 和辣椒疫霉 (*P. capsici*) 等多种疫霉菌对甲霜灵产生了抗药性, 并在生物学性状、致病力以及抗性遗传等方面进行了初步研究^[10~17]。本研究采用甲霜灵药剂驯化的方法处理野生大豆疫霉菌, 获得抗药菌株, 初步研究其部分生物学特性, 以明确甲霜灵对大豆疫霉菌生物学性状的影响, 为科学利用甲霜灵防治大豆疫病提供理论依据。同时, 为构建野生菌株和抗甲霜灵诱变菌株的 AFLP - DNA 指纹图谱提供试验材料, 为进一步研究大豆疫霉菌对甲霜灵产生抗性的分子机理作前期准备。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆疫霉菌株 HLJ - SH 由黑龙江大学农学院提供; 菌株 98 - 6、23D、6D、Pmg1、5 号由东北农业大学大豆中心提供。以上菌株均采集于黑龙江省大豆主要种植区。甲霜灵 (Metalaxyl) 95% 原药, 温州鹿城农药厂出品。

1.2 方法

1.2.1 野生菌株对甲霜灵的敏感性测定 将供试大豆疫霉菌株在胡萝卜琼脂培养基 (CA) 平板上培养 5d 后, 转接到含 1.0μg/mL 和 5.0μg/mL 甲霜灵的 CA 平板上培养, 测量 7d 后的菌落直径, 观察菌落形态。每个处理 3 个重复。以不加甲霜灵的处理为对照。

1.2.2 抗甲霜灵菌株的诱导 结合 Chang^[18] 和左豫虎等^[11] 的方法, 将菌株 Pmg1 置于 CA 平板上, 25℃ 黑暗培养 5d, 然后转移至含甲霜灵 1.0、2.5、5.0 和 10.0μg/mL 的 CA 平板上, 每培养皿接种 1 块, 每菌株接种 3 皿。置于 25℃ 黑暗培养, 观察菌丝生长情况。将菌丝块边缘产生的快速生长角变区分别移至含 1.0、2.5、5.0 和 10.0μg/mL 甲霜灵的 CA 平板上, 直至找到能在含相应浓度甲霜灵的 CA 平板上正常生长的抗药突变菌株为止。具有甲霜灵抗性的菌株用 Mt^r 表示。

1.2.3 抗甲霜灵菌株的抗性水平测定 参照高智谋等^[10] 的方法并稍做改动, 将在 CA 平板上培养 5d 的抗药菌株沿菌落边缘打取直径为 7mm 的菌饼, 分别移到含有 0.0、1.0、10.0、50.0、100.0、500.0、800.0、1 000.0、1 500.0、2 000.0μg/mL 甲霜灵的 CA 平板上培养。对照野生亲本菌株 Pmg1 按上述方法分别移到含有 0.0、0.01、0.05、0.1、0.5、1.0、10.0μg/mL 甲霜灵的 CA 平板上培养。培养条件为 25℃ 黑暗, 每个处理 3 次重复, 测量 4d 后的菌落直径, 计算菌丝生长抑制率和 EC₅₀, 以抗药菌株的 EC₅₀ 值与野生菌株的 EC₅₀ 值之比计算各突变株的抗性水平^[10]。

1.2.4 抗药菌株的抗药稳定性检测 结合高智谋等^[10] 和左豫虎等^[11] 的方法, 将筛出的抗药菌株分别接在不含甲霜灵和含甲霜灵 10.0 μg/mL 的 CA 平板上培养, 5、10、15、20、30d 后分别转移至不含甲霜灵和含甲霜灵 10.0μg/mL 的 CA 平板上, 并测量第 5d 的菌落直径, 以野生亲本 Pmg1 作对照, 每个处理 3 个重复。测定抗药菌株抗药性的稳定性。

1.2.5 抗药菌株的生长速率及菌落、菌丝形态 将抗药菌株移至含甲霜灵 10.0μg/mL 的 CA 培养基上, 野生亲本 Pmg1 移至不加甲霜灵的 CA 培养基上, 置于 25℃ 黑暗培养 5d 后均转移至不含甲霜灵的 CA 上, 5d 后测量菌落直径, 并观察菌丝形态。每个处理 3 个重复。

将供试菌株在 CA 平板上 25℃ 黑暗培养 6d, 挑取菌丝, 均匀地分布在载玻片上, 在光学显微镜下随机选取 20 个视野, 观察菌丝形态。

1.2.6 游动孢子囊、卵孢子产生能力和形态观察 结合左豫虎等^[19] 和兰成忠等^[20] 的方法诱导产游动孢子囊, 将供试菌株在 CA 平板上 25℃ 黑暗培养 5d, 用无菌打孔器在菌落边缘内侧打取直径为 7mm 的菌饼, 挑取 10 块菌饼接入无菌的培养皿中, 加入适量无菌水, 使其刚好湿润浸没, 每隔 30min 换一次水, 换 4 次后加入 15mL Petri 培养液, 25℃ 黑暗培养

22 ~ 24 h 后,在光学显微镜下观察,随机选取 40 个 $2.0 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ 大小的面积,记录每个 $2.0 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ 面积中游动孢子囊的数量。每个菌株 3 个培养皿。

供试菌株在 CA 平板上 25℃ 黑暗培养 10d 后,将培养皿置于光学显微镜下,随机选取 20 个 $2.0 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ 大小的面积,记录每个 $2.0 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ 面积中卵孢子的数量。

2 结果与分析

2.1 野生型菌株对甲霜灵的敏感性测定

根据表 1 可知,各供试菌株在甲霜灵浓度为 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时菌落生长都受到显著抑制,其中供试 23D 在含甲霜灵 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 CA 平板上不生长。在含 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 甲霜灵的 CA 培养基上只有 Pmg1 的生长

速率为 0.4mm/d,其他菌株均不生长。此外,在含甲霜灵的 CA 平板上,Pmg1 的菌落边缘出现不明显角变区,因此选择菌株 Pmg1 作为野生亲本来筛选抗药菌株。

野生菌株 Pmg1 对甲霜灵的敏感性测定结果表明(表 2),供试菌株 Pmg1 在不含甲霜灵的 CA 培养基上生长速率为 6.5mm/d,而在含甲霜灵 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 CA 培养基平板上菌丝生长开始受到抑制,生长速率为 5.4 mm/d;在含甲霜灵 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 CA 培养基上生长受到显著性抑制,生长速率为 1.7mm/d;在含甲霜灵 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 CA 培养基上,生长速率仅为 0.3mm/d,几乎不生长,并从含甲霜灵 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 CA 培养基平板上开始出现不明显角变区。

表 1 大豆疫霉供试菌株对甲霜灵的敏感性
Table 1 Sensitivity of *P. sojae* isolates to metalaxyl

甲霜灵浓度 Metalaxyl content/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	菌株生长速率 Growth rate/(mm/d)					
	98-6	23D	6D	Pmg1	HLJ-SH	5号
0.0	5.3a	5.1a	3.3a	6.4a	2.8a	9.4a
1.0	0.3b	0.0b	0.5b	0.9b	0.4b	0.3b
5.0	0.0c	0.0c	0.0c	0.4c	0.0c	0.0c

注:同一列内比较,不同字母代表在 0.05 水平有显著性差异 $P=0.05$ (Duncan's)。下同
Note: Different letters within a row indicated significant difference of $P=0.05$ (Duncan's). Same as below

表 2 野生菌株 Pmg1 和抗药菌株在含不同浓度甲霜灵 CA 平板上的生长速率
Table 2 Growth rates of wild-type parent Pmg1 and Mr^I isolates on CA with different metalaxyl content

甲霜灵浓度 Metalaxyl content /($\mu\text{g}/\text{mL}$)	甲霜灵抗性菌株生长速率 Growth rates of metalaxyl-resistant isolates/(mm/d)					甲霜灵浓度 Metalaxyl content /($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Pmg1 生长速率 Growth rates of Pmg1/(mm/d)
	Pmg1-Mt ^I 1	Pmg1-Mt ^I 2	Pmg1-Mt ^I 3	Pmg1-Mt ^I 4	Pmg1-Mt ^I 5		
0.0	3.8 a	2.9 a	3.6 d	4.6 b	4.1 a	0.00	6.5a
1.0	3.9 a	2.9 a	4.1 bc	4.5 b	4.1 a	0.01	5.4b
10.0	3.9 a	3.0 a	4.6 a	4.7 ab	3.9 a	0.05	4.6c
50.0	3.9 ab	3.1 a	3.8 cd	4.6 b	3.8 a	0.10	3.9d
100.0	3.7 b	3.1 a	4.3 b	5.0 a	4.1 a	0.50	1.7e
500.0	2.0 c	2.1 b	3.1 e	2.4 c	3.3 b	1.00	0.9f
800.0	1.2 d	1.2 c	1.4 f	1.6 d	1.5 c	10.00	0.3f
1 000.0	0.9 e	0.9 d	1.1 g	1.4 d	0.9 d	-	-
1 500.0	0.4 f	0.4 e	0.3 h	0.5 e	0.2 e	-	-
2 000.0	0.3 f	0.0 f	0.0 i	0.2 e	0.0 e	-	-

2.2 抗甲霜灵菌株的诱导

通过在含不同浓度甲霜灵的 CA 平板上筛选抗药菌株发现,在 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 CA 平板上出现明显快速生长的角变区(图 1),将该角变区视为第一代角变区并移至 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 CA 平板上培养,待出现第二代角变区后再移至 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 CA 平板上,并按此方法得到第四代角变区。发现第四代角变区在 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 CA 平板上能够均匀地生长,不再出现角变区。将第四代角变区移接至含有甲霜灵 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 CA 平板上,依然能较好地生长,即为抗甲霜灵菌株 Pmg1-Mt^I1。通过该方法在含

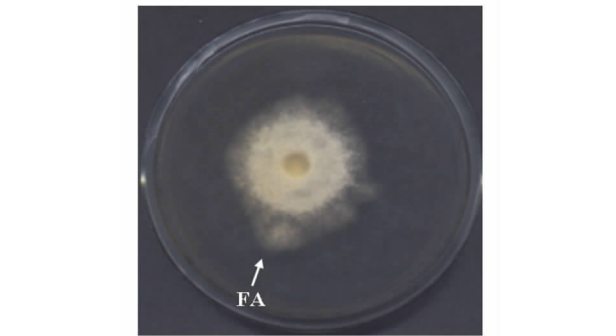


图 1 野生菌株 Pmg1 在含甲霜灵 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CA 平板上的第一代角变区(FA)
Fig. 1 First angle(FA) of *P. sojae* wild-type parent Pmg1 incubated on CA with 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ metalaxyl

甲霜灵 10.0μg/mL 的 CA 平板上获得另外 4 株抗甲霜灵菌株 Pmg1 – Mt^r2、Pmg1 – Mt^r3、Pmg1 – Mt^r4、Pmg1 – Mt^r5。

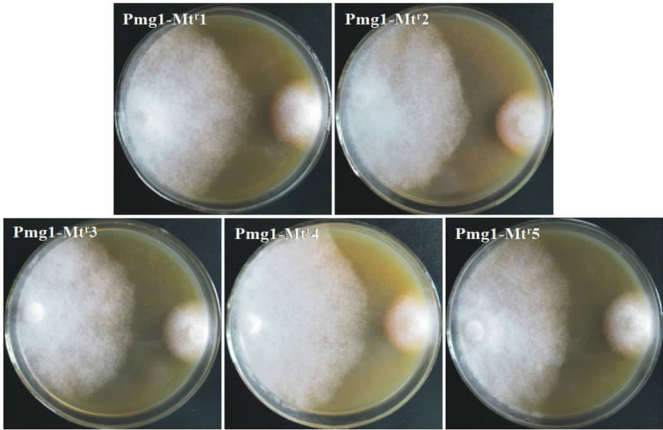
2.3 抗甲霜灵菌株的抗性水平测定

根据表 2 可知,抗药菌株的生长速率在甲霜灵浓度 0.0 到 100.0μg/mL 之间差异不显著,即说明

在甲霜灵浓度 0.0 到 100.0μg/mL 之间抗药菌株对甲霜灵不敏感。而在含甲霜灵浓度 500.0μg/mL 的培养基上生长受到显著性抑制,在 2 000.0μg/mL 的培养基上几乎不生长。说明本研究获得的抗药菌株对甲霜灵均具有较高的抗性,抗药菌株的抗性水平可达到 3 793.7 ~5 476.0 倍(表 3 和图 2)。

表 3 大豆疫霉抗药菌株对甲霜灵的抗性水平
Table 3 Metalaxyl – resistance levels of Mr^t isolates in *P. sojae*

菌株 Strain	回归方程 Virulence linear regression equation	相关系数 r	EC ₅₀ /(μg/mL)	抗性水平 Resistance level
Pmg1 – Mt ^r 1	Y =2.540 8x – 1.852 5	0.998 4	497.730 0	3 793.7
Pmg1 – Mt ^r 2	Y =5.554 9x – 10.91 3	0.931 2	732.318 5	5 581.7
Pmg1 – Mt ^r 3	Y =6.215 9x – 12.89 8	0.968 5	757.530 3	5 773.9
Pmg1 – Mt ^r 4	Y =0.825 2x – 1.752 6	0.981 2	578.495 5	4 409.3
Pmg1 – Mt ^r 5	Y =6.314 5x – 13.03 7	0.989 1	718.455 7	5 476.0
Pmg1 (Wild – type isolate)	Y =0.986 4x +5.862 2	0.988 6	0.131 2	–



注:每个平皿中左侧为抗药菌株,右侧为野生亲本 Pmg1
Note: In all plates above, Mt^r isolate on the left and *P. sojae* wild – type parent Pmg1 on the right

图 2 菌株于含甲霜灵 10μg/mL 的 CA 平板上 25℃黑暗培养 9d 的形态
Fig. 2 *P. sojae* incubated in darkness for 9 days at 25℃ on CA with 10μg/mL metalaxyl

表 4 甲霜灵对 Mt^r 抗性菌株在菌丝生长过程中抗性保持的影响
Table 4 Effect of metalaxyl on maintaining Mt^r resistant – isolates of *P. sojae* during hyphal growth

菌株 Strain	培养基 Medium	不同时间处理下菌丝生长速率 Rate of hyphal growth under different treatment time/(mm/d)				
		5 d	8 d	15 d	20 d	30 d
Pmg1 – Mt ^r 1 – M	Contained metalaxyl	4.0 b	4.8 a	3.8 b	4.1 b	3.3 c
	CK	4.2 b	4.8 a	3.8 c	3.9 c	3.3 d
Pmg1 – Mt ^r 1 – 0	Contained metalaxyl	3.9 b	4.5 a	4.3 a	4.3 a	3.8 b
	CK	4.0 abc	4.3 a	3.8 bc	4.2 ab	3.7 c
Pmg1 – Mt ^r 5 – M	Contained metalaxyl	4.0 c	4.3 b	5.0 a	4.4 b	3.6 d
	CK	3.7 c	4.2 b	4.7 a	4.6 a	3.6 c
Pmg1 – Mt ^r 5 – 0	Contained metalaxyl	3.8 c	4.8 a	4.9 a	4.1 b	3.7 c
	CK	3.9 b	4.5 a	4.5 a	4.2 ab	3.2 c
Pmg1 (Wild – type isolate)	CK	6.5	7.0	7.2	7.3	6.6

注:–M 表示抗药菌株在含甲霜灵 10.0 μg/mL 的 CA 平板上培养;–0 表示抗药菌株在不含甲霜灵的 CA 上培养,CK 表示不含甲霜灵的培养基;培养基中甲霜灵含量为 10.0 μg/mL;同一行内比较,字母相同的表示差异不显著 $P=0.05$ (Duncan^s)
Note:–M;resistant – isolates on the plates of CA with 10μg/mL metalaxyl;–0;resistant – isolates on the plates of metalaxyl – free CA;CK;Medium without metalaxyl. Content of metalaxyl in the medium was 10.0μg/mL; Comparion within a row ,the same letter indicated no significant difference $P=0.05$ (Duncan^s)

2.4 抗药菌株的稳定性检测

抗药菌株 Pmg1 – Mt^r1 和 Pmg1 – Mt^r5,同时在

不含甲霜灵和含甲霜灵 10.0μg/mL 的 CA 平板上培养至第 5、10、15、20、30d 后,转移至不含甲霜灵和

含甲霜灵 10.0μg/mL 的 CA 平板上,生长速率虽然存在不同程度的差异(表 4),但均能够正常生长且菌落形态无明显差异,表明 Mt^r 抗药菌株在菌丝阶段抗性的保持对甲霜灵并无依赖性,即使长时间不接触甲霜灵,其抗性也不会下降或丧失。

2.5 抗药菌株的生长速率及菌落、菌丝形态

抗药菌株 Pmg1 - Mt^r1、Pmg1 - Mt^r2、Pmg1 - Mt^r3、Pmg1 - Mt^r4、Pmg1 - Mt^r5 在 CA 培养基上的生长速率分别为 3.6、4.1、4.0、4.0、4.0mm/d,与野生菌株 Pmg1 6.6 mm/d 的生长速率有显著性差异($P=0.05$)。与野生亲本相比,抗药菌株生长慢,气生菌丝发达,呈棉絮状(图 3)。

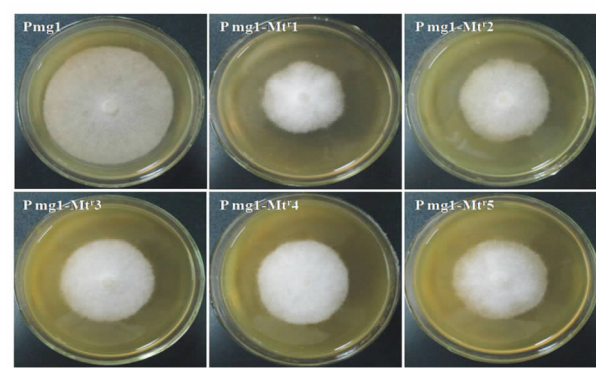
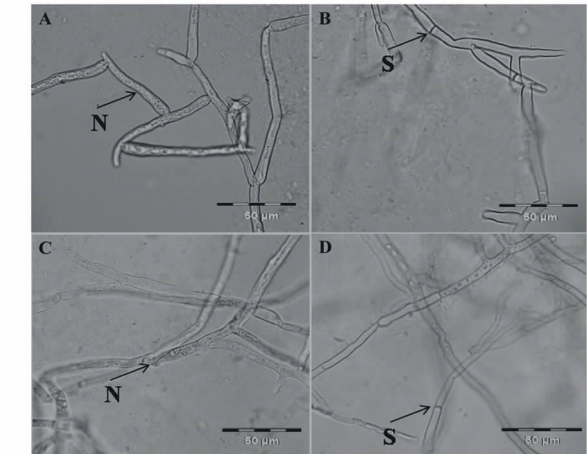


图 3 菌株于 CA 平板上 25℃ 黑暗培养 5d 的菌落形态
Fig.3 Colonial morphology of *P. sojae* incubated in darkness for 5d at 25℃ on CA

通过显微镜观察培养 5d 的菌丝发现,抗药菌株的菌丝在形态上并没有发生突变,与野生亲本 Pmg1 的菌丝同为珊瑚状,近直角分支,菌丝分支处缢缩,菌落边缘的幼龄菌丝无横隔多核,靠近菌落中间的老龄菌丝具有横隔(图 4)。



注:A:Pmg1 - Mt^r1 的幼龄菌丝;B:Pmg1 - Mt^r1 的老龄菌丝;
C:Pmg1 的幼龄菌丝;D:Pmg1 的老龄菌丝;N:无隔菌丝;S:有隔菌丝
Note:A:young hypha of Pmg1 - Mt^r1; B:old hypha of Pmg1 - Mt^r1;
C:young hypha of Pmg1; D:old hypha of Pmg1;
N:nonseptate hypha;S:septate hypha

图 4 抗药菌株 Pmg1 - Mt^r1 和野生菌株 Pmg1 的菌丝形态
Fig.4 Hyphae of Mt^r mutant Pmg1 - Mt^r1 and *P. sojae* wild - type parent Pmg1

2.6 游动孢子囊、卵孢子产生能力和形态观察

抗药菌株的游动孢子囊数量与野生菌株 Pmg1 有显著差异($P=0.05$),而抗药菌株之间并无显著差异。抗药菌株 Pmg1 - Mt^r1、Pmg1 - Mt^r2、Pmg1 - Mt^r3、Pmg1 - Mt^r4、Pmg1 - Mt^r5 的游动孢子囊数分别为 575、400、350、400、312.5 个/cm²,而野生菌株 Pmg1 为 775 个/cm²。与野生菌株 Pmg1 相比,抗药菌株所产生的游动孢子囊在形态上并无明显变异,孢子囊均为单生或有简单分支,顶生,倒梨型或长椭圆型(图 5)。

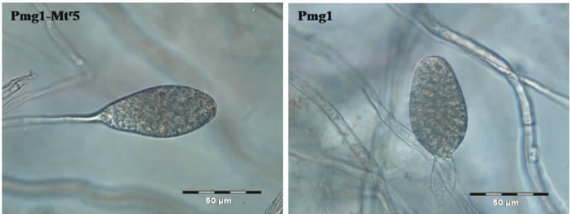


图 5 抗药菌株 Pmg1 - Mt^r5 和野生菌株 Pmg1 产生的游动孢子囊
Fig.5 Zoosporangium of Mt^r isolate Pmg1 - Mt^r5 and *P. sojae* wild - type parent Pmg1

抗药菌株的卵孢子数量与野生菌株 Pmg1 有显著差异($P=0.05$),抗药菌株之间并无显著差异。抗药菌株 Pmg1 - Mt^r1、Pmg1 - Mt^r2、Pmg1 - Mt^r3、Pmg1 - Mt^r4、Pmg1 - Mt^r5 的卵孢子数分别为 1 325、900、325、525、2 225 个/cm²,而野生菌株 Pmg1 为 23 400 个/cm²(图 6)。抗药菌株的卵孢子壁颜色较深,但在形态上没有发生明显变异,与野生亲本 Pmg1 同样表现为:雄器不规则,一般侧生,偶有围生;藏卵器壁薄,无饰纹,球形或亚球形;卵孢子壁厚,光滑,细胞质呈颗粒状(图 6)。

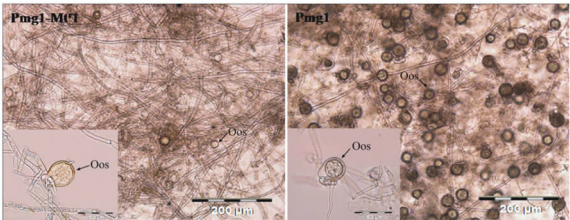


图 6 抗药突变株 Pmg1 - Mt^r1 和野生菌株 Pmg1 的卵孢子(Oos)
Fig.6 Oospores(Oos) of Mt^r isolate Pmg1 - Mt^r1 and *P. sojae* wild - type parent Pmg1

3 讨论

甲霜灵对疫霉的作用位点单一,选择性抑制核糖体 RNA 聚合酶, RNA 聚合酶的突变会导致某些疫霉菌对甲霜灵产生抗药性^[21~23]。高智谋等^[10]、左豫虎等^[11]、崔林开等^[24]先后采用药剂驯化的方

法分别获得了对甲霜灵具有较高抗性的苎麻疫霉、大豆疫霉抗药性菌株。本研究中,通过药剂驯化方法对供试大豆疫霉菌进行抗甲霜灵诱变,获得了5株高抗甲霜灵的抗药性突变株,抗性水平可达到野生亲本的3 793.7~5 773.9倍之间,并发现其抗药性在菌丝阶段的保持对甲霜灵无依赖性,即使长时间不接触甲霜灵,其抗性也不会下降或丧失。该结果与左豫虎等^[11]得到的大豆疫霉抗甲霜灵菌株的结果相一致。而高智谋等^[10]所获得苎麻疫霉抗甲霜灵菌株的抗性不稳定,在一段时间不接触甲霜灵后,其抗药性下降或丧失。以上情况正如王源超等^[25]在研究中提到,不同疫霉中甚至同一种的不同菌株对甲霜灵产生抗药性的遗传背景可能有较大的差异。

另外,Cafe' - Filho^[26]和戚仁德等^[13]对抗甲霜灵的辣椒疫霉菌株的研究中发现,辣椒疫霉抗甲霜灵菌株的形态特征与敏感菌株相似,主要生物学性状与敏感菌株无显著差异。在本研究中,与野生亲本Pmg1相比,虽然抗药菌株的生长速率减慢,气生菌丝更发达,但采用光学显微镜观察发现,抗药菌株的菌丝、游动孢子囊和卵孢子的形态,与野生亲本Pmg1并无明显差异,这表明其主要的形态特征未因大豆疫霉菌对甲霜灵产生抗性突变而改变。然而抗药菌株的游动孢子囊产生能力显著下降,卵孢子的产量也明显减少。这一点与Rana等^[27]、李宝筠等^[15]和王源超等^[28]的研究中所提到甲霜灵可抑制恶疫霉、大雄疫霉和棉疫霉菌卵孢子产量的结果相一致。这些研究表明甲霜灵除抑制疫霉RNA聚合酶外,可能还涉及到对有性生殖等其他生理代谢方面的影响。由于大豆疫霉菌主要通过卵孢子越冬,故卵孢子数量的减少可能对抗药菌株在自然界的越冬产生一定的影响。

本研究中并没有使用任何诱变剂,而是在甲霜灵选择压力下获得了高抗甲霜灵的抗药性突变株。可能原因,一是在含甲霜灵培养基上培养导致大豆疫霉菌产生了抗药性;二是由于生产上应用甲霜灵导致田间出现抗性菌株,在分离到的菌株中含有抗性单株,试验中甲霜灵只是起到筛选剂的作用。不论何种原因均说明大豆疫霉菌容易对甲霜灵产生抗药性。因此,在防治大豆疫霉根腐病时,要合理使用甲霜灵,注意轮换用药,将甲霜灵与其他作用方式的化学药剂交替使用或者混配使用,避免单一药剂使用。大豆疫霉菌对甲霜灵抗性的产生并没有伴随着形态特征的改变,在遗传物质上的改变还要进行更深层的探索与研究。本研究小组后续研究将构建

野生菌株和抗甲霜灵菌株的AFLP - DNA指纹图谱,以期进一步明确大豆疫霉菌对甲霜灵抗性产生的分子机理。

致谢:本项目得到旱区作物逆境生物学国家重点实验室西北农林科技大学康振生教授的支持,以及东北农业大学张淑珍教授、黑龙江大学马淑梅教授惠赠的大豆疫霉菌株98 - 6、23D、6D、Pmg1、5号和HLJ - SH,一并感谢。

参考文献:

[1] Tyler B M. *Phytophthora sojae*: root rot pathogen of soybean and model oomycete[J]. Molecular Plant Pathology, 2007,8:1 - 8.

[2] 苏彦纯,沈崇尧. 大豆疫霉菌在中国的发现及其生物学特性的研究[J]. 植物病理学报,1993,23(4):341 - 347.

[3] 陈申宽,闫任沛,王秋荣,等. 呼伦贝尔盟大豆疫霉根腐病的发生及防治技术研究[J]. 内蒙古民族大学学报:自然科学版,2002,17(3):223 - 227.

[4] 朱振东,王化波,王晓鸣,等. 中国大豆疫霉菌分布及毒力多样性研究[J]. 中国农业科学,2003,36(7):793 - 799.

[5] 陈庆河,翁启勇,王源超,等. 福建省大豆疫病病原鉴定及其核糖体DNA - ITS序列分析[J]. 植物病理学报,2004,34(2):112 - 116.

[6] 王 华,李国英,战 勇,等. 新疆大豆根腐疫病鉴定初报[J]. 新疆农业科学,2006,43(2):106 - 108.

[7] 徐静静,蔺 宇,董立明,等. 用SSR标记和巢式PCR快速检测大豆疫霉菌[J]. 中国农业科学,2009,42(5):1 624 - 1 630.

[8] 潘凤娟,许艳丽,李春杰,等. 不同土壤类型和纬度大豆田植物线虫分布特征[J]. 大豆科学,2009,28(5):869 - 874.

[9] Joseph M C, Coffey M D. Development of laboratory resistance to metalaxyl in *Phytophthora citricola*[J]. Phytopathology,1984,74(12):1 411 - 1 414.

[10] 高智谋,郑小波,陆家云. 苎麻疫霉对甲霜灵抗性的遗传研究[J]. 南京农业大学学报,1997,20(3):54 - 59.

[11] 左豫虎,侯巨梅,康振生,等. 大豆疫霉菌抗甲霜灵特性研究[J]. 菌物学报,2005,24(3):422 - 428.

[12] Davides L C. Resistance to acylalanine fungicides in *Phytophthora megasperma* f. sp. *medicaginis*[J]. Netherlands Journal of Plant Pathology,1981,87(1):11 - 24.

[13] 戚仁德,汪 涛,高智谋,等. 抗甲霜灵辣椒疫霉菌株的生物学特性[J]. 植物保护学报,2011,38(5):449 - 454.

- [14] 王建营,郑小波. 恶疫霉致病力和对甲霜灵敏感性的遗传与变异[J]. 菌物学报,2001,20(3):337-341.
- [15] 李宝笃,彭友付,沈崇尧. 大豆疫霉菌对甲霜灵(Metalaxyl)的敏感性及其变异[J]. 植物病理学报,1993,25(1):23-27.
- [16] Timmer L W, Graham J H, Zitko S E. Metalaxyl-resistant isolates of *Phytophthora nicotianae*: occurrence, sensitivity, and competitive parasitic ability on citrus[J]. Plant Disease,1998,82(2):254-261.
- [17] Parra G, Ristaino J B. Resistance to mefenoxam and metalaxyl among field isolates of *Phytophthora capsici* causing Phytophthora blight of bell pepper[J]. Plant Disease,2001,85(10):1 069-1 075.
- [18] Chang T T, Ko W H. Resistance to fungicides and antibiotics in *Phytophthora parasitica*: genetic nature and use in hybrid determination[J]. Phytopathology, 1990, 80(12):1 414-1 491.
- [19] 左豫虎,臧忠婧,刘惕若. 影响大豆疫霉菌(*Phytophthora sojae*)游动孢子产生的条件[J]. 植物病理学报,2001,31(3):241-246.
- [20] 兰成忠,陈庆河,赵健,等. 诱导大豆疫霉菌大量产生游动孢子囊的最佳方法研究[J]. 江西农业大学学报,2007,29(4):557-560.
- [21] Davidse L C, Hofman A E, Velthuis G C M. Specific interference of metalaxyl with endogenous RNA polymerase activity in isolated nuclei from *Phytophthora megasperma* f. sp. *medicaginis* [J]. Experimental Mycology,1983,7(4):344-361.
- [22] Fisher D J, Hayes A L. Studies of mechanisms of metalaxyl fungitoxicity and resistance to metalaxyl[J]. Crop Protection,1984,3(2):177-185.
- [23] Horst L. Modern selective fungicides: Properties, applications, mechanisms of action[M]. New York: Gustav Fischer Verlag, Jena Stuttgart,1995.
- [24] 崔林开,李井干,陆静,等. 大豆疫霉菌对甲霜灵抗性风险的研究[J]. 南京农业大学学报,2013,36(1):47-51.
- [25] 王源超,郑小波,陆家云. 疫霉菌对甲霜灵抗性的研究现状[J]. 植物保护,1994,20(6):29-31.
- [26] Café-Filho A C, Ristaino J B. Fitness of isolates of *Phytophthora capsici* resistant to mefenoxam from squash and pepper fields in North Carolina[J]. Plant Disease,2008,92(10):1 439-1 443.
- [27] Rana K S, Gupta V K. Effect of fungicides on the viability of *Phytophthora cactorum* propagules in the soil[J]. Phytopathologische Zeitschrift,1984,110(3):245-250.
- [28] 王源超,陈庆河,郑小波,等. 甲霜灵抑制棉疫病病菌卵孢子的产生[J]. 植物保护学报,1997,24(2):175-178.

(责任编辑:王丽芳)