

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (5) :627 - 634; 4 May 2015
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140382

抗甲霜灵辣椒疫霉菌的环境适合度

王光飞, 马艳*

江苏省农业科学院农业资源与环境研究所, 江苏 南京 210014

摘要:【目的】研究抗甲霜灵辣椒疫霉菌的环境适合度, 对于评估甲霜灵防治辣椒疫霉的抗药性风险具有重要意义。【方法】以室内药剂驯化的抗甲霜灵辣椒疫霉菌株 Pc2-3 为研究对象, 分析比较其与原始敏感菌株 Pc2 的主要生物学特性、生长竞争力、致病力及土壤适合度等环境适合度指标。【结果】Pc2-3 孢子囊产生量 (3 d 后)、孢子囊释放率 (24 h 后) 和游动孢子萌发率 (8 h 后) 分别是 Pc2 的 0.44、0.09 和 0.54 倍。Pc2-3 可生长温度和 pH 范围及最适生长温度与 Pc2 基本一致, 但菌丝生长速率低于 Pc2。竞争力测定显示, 在胡萝卜 (CA) 平板培养条件下, Pc2-3 生长极显著弱于 Pc2。盆栽致病试验显示, Pc2-3 对辣椒植株的致病率为 14.3%, 明显低于 Pc2 (88.6%)。两者等量混合后接种, 辣椒植株的发病率为 75.7%, 接近单独接种 Pc2 时的发病率, 且所有病株分离出的辣椒疫霉菌均为甲霜灵敏感型。分别将 Pc2-3 和 Pc2 游动孢子加入自然土壤培养 20 d 后, 实时定量 PCR 检测显示 Pc2-3 数量是 Pc2 的 0.28 倍, 当土壤中含有 300 mg/kg 干土的甲霜灵, 则前者为后者的 0.42 倍。此外, 2 个菌株最适存活土壤温度和湿度基本一致, 当土壤温度和湿度利于辣椒疫霉存活时, Pc2-3 土壤适合度显著低于 Pc2, 不利于辣椒疫霉存活时, Pc2-3 土壤适合度略低于 Pc2。【结论】抗甲霜灵菌株 Pc2-3 环境适合度弱于原始敏感菌株 Pc2。

关键词: 辣椒疫霉, 甲霜灵抗药性, 环境适合度

中图分类号: Q938 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 05-0627-08

辣椒疫病是由辣椒疫霉菌 (*Phytophthora capsici leoniana*) 引起的世界范围内各辣椒产区普遍发生的土传病害^[1]。化学防治仍然是防控辣椒疫病的有效手段之一, 甲霜灵是一种苯基酰胺类内吸性杀菌剂, 可有效防控多种疫霉菌引起的植物病害。但该类药剂属于特异位点抑制剂, 作用位点单一, 病原菌易产生抗药性^[2]。自 20 世纪 70 年代末起长期大面积的施用甲霜灵使得疫霉菌对该类药剂的抗药性问题日趋严重^[3-6]。同时, 由于辣椒疫霉是土传病原菌, 流行性强, 随水流传播迅速, 再侵染频繁^[7], 对

杀菌剂具有潜在的高抗药性风险。因此, 研究抗甲霜灵辣椒疫霉菌株的环境适应性对评估甲霜灵防控辣椒疫霉的抗药性风险有至关重要的意义。

国内外不乏关于抗甲霜灵的疫霉属菌株的生物学性状和环境适应性研究, 但种间差异性较大, 与疫霉菌本身的特性及来源紧密相关。郑小波等^[8]报道, 室内诱变的大多数抗甲霜灵大雄疫霉菌株和恶疫霉菌株孢子囊产生能力下降。Stack 等^[9]的研究显示, 大雄疫霉抗性菌株的生长速率、孢子囊产生量、孢子萌发率及致病力与敏感菌株相似。Gisi

基金项目: 农业部公益性行业专项 (201303023)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-25-84390248; E-mail: myjaas@sina.com

作者简介: 王光飞 (1988 -), 男, 江西婺源人, 硕士, 主要从事土壤微生物研究。E-mail: wy_wgf@163.com

收稿日期: 2014-07-30; 修回日期: 2014-09-07

等^[10]研究指出致病疫霉抗性菌株在马铃薯块茎上越冬存活率较野生型菌株弱。而 Holmes 等^[11]研究表明致病疫霉抗性菌株平板竞争能力与敏感菌株一致,但田间适应性较敏感菌株差。目前,关于抗甲霜灵辣椒疫霉菌的环境适合度鲜有报道。Bower 等^[12]研究显示抗甲霜灵辣椒疫霉菌株的致病力和孢子囊产生能力等均强于敏感菌株。威仁德等^[13]对几株田间和室内诱变抗甲霜灵辣椒疫霉菌株进行了研究,发现抗性菌株孢子囊产生量、孢子囊释放率、游动孢子萌发率、菌丝生长速率及对果实致病力均与敏感菌株无显著差异。抗甲霜灵辣椒疫霉菌的环境适合度不仅与生物学特性相关,还与其在环境中的生长繁殖能力、竞争能力和致病力等密切相关^[14]。因此,为明确抗甲霜灵辣椒疫霉菌的环境适合度,作者开展了进一步的相关研究。

笔者通过室内药剂驯化获得能稳定遗传抗药性的抗甲霜灵辣椒疫霉菌株,并对比分析了其与原始敏感菌株的主要生物学特性、竞争力、致病力和土壤适合度等环境适合度指标,以评估抗甲霜灵辣椒疫霉菌是否具有良好的环境适应性,从而导致甲霜灵防效失败的可能。我们的试验结果可为系统进行甲霜灵等化学药剂防治辣椒疫病的风险评估和制定科学的治理措施提供理论参考。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试菌株:Pc2-3(抗甲霜灵辣椒疫霉菌株)和 Pc2(甲霜灵敏感型辣椒疫霉菌株),Pc2-3 由 Pc2 经室内药剂驯化所得。甲霜灵敏感性测试结果显示,Pc2-3 和 Pc2 的 EC_{50} 值分别为 173.09 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 1.18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

供试土壤:淮安耕作土,理化性状:pH7.72;土壤有机质含量 15.42 g/kg;全氮含量 1.25 g/kg;全磷含量 1.37 g/kg;全钾含量 6.56 g/kg。

胡萝卜培养基(CA)用于辣椒疫霉的培养^[15];供试辣椒品种为“春色满园”;供试 98% 甲霜灵由南京农业大学植物保护学院提供。

1.2 抗甲霜灵辣椒疫霉菌的主要生物学特性测定

1.2.1 抗甲霜灵辣椒疫霉菌孢子囊产生、释放游动孢子和游动孢子萌发率特性测定:供试菌株在 CA 平板培养 3 d 后,沿菌落边缘切取 5 块直径 8 mm 菌

丝块于装有 5 mL 无菌水试管中,28℃ 下 12000 Lux 光照培养,分别在 1、2 和 3 d 后用力摇晃试管至孢子囊脱落完全后,镜检记录孢子囊数量。取培养 2 d 产生的孢子囊,用于定期观察孢子囊释放游动孢子情况。将同期孢子囊悬液置于 4℃ 环境下,待大部分孢子囊释放游动孢子后,取 20 μL 悬液滴于平板上,静置于 28℃ 黑暗环境,4 h 和 8 h 后镜检计数游动孢子总数和萌发的游动孢子数以计算游动孢子萌发率,重复 5 次。

1.2.2 抗甲霜灵辣椒疫霉菌的生长温度及生长初始 pH 范围测定:供试菌株在 CA 平板培养 3 d 后,沿菌落边缘切取 4 mm 菌丝块移至 CA 平板中央,分别置于 5、10、15、20、22、25、28、30、33、35 和 38℃ 黑暗中培养,4 d 后测量菌落直径,每个处理 5 个重复。根据菌丝生长情况,确定 Pc2 和 Pc2-3 的生长温度范围和最适生长温度。

CA 培养基灭菌后的 pH 为 6.2,用无菌 0.2 mol/L NaOH 和 0.2 mol/L HCl 调节灭菌后的 CA 培养基,使得培养基初始 pH 值分别为 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12,随即倒平板,在平板中央接种培养 3 d 的供试菌株 4 mm 菌丝块,每处理 5 个重复。置 28℃ 黑暗条件下培养 4 d 后,测量菌落直径。根据菌丝生长情况,确定抗甲霜灵辣椒疫霉菌的生长 pH 范围和最适生长 pH。

1.3 抗性菌株和敏感菌株在平板上的生长竞争测定

制备 Pc2-3 和 Pc2 菌株的游动孢子液,稀释至 10^3 个游动孢子/mL 后,将 2 个菌株的游动孢子以 0:1、1:4、1:1、4:1 和 1:0 数量比例混合,分别取 100 μL 混合游动孢子液涂布在 CA 平板上,培养 40 h 后各处理分别取 30 株单菌落,将单菌落接种到含 50 mg/L 甲霜灵的 CA 平板上,能正常生长的则为抗性菌株,不能生长的则为敏感菌株。以混合培养一代后产生的单菌落的抗性比例来判定两者平板生长竞争状况。

1.4 抗甲霜灵辣椒疫霉菌的土壤适合度研究

1.4.1 抗甲霜灵辣椒疫霉菌在不同温度和湿度土壤中的数量变化:制备 Pc2-3 和 Pc2 菌株的游动孢子液,将孢子液分别加入试验土壤中,使得土壤辣椒疫霉数量为 500 个游动孢子/g 干土。在土壤含水量为 20% 的前提下,设置 3 个土壤温度,分别为 5、25 和 35℃。在土壤温度为 25℃ 的前提下,设置 3

个土壤含水量,分别为 10%、20% 和 30%。共计 5 个处理: 5℃, 20%; 25℃, 20%; 35℃, 20%; 25℃, 10%; 25℃, 30%。分别在培养 0、5 和 20 d 后取样,采用定量 PCR 测定样品中的辣椒疫霉菌数量^[16],以分析比较抗性菌株和敏感菌株在不同土壤温度和土壤湿度下土壤适合度的差异性。

1.4.2 抗甲霜灵辣椒疫霉菌在自然土壤和含有甲霜灵土壤中的数量变化: 将 5000 mg/L 甲霜灵母液均匀喷洒在试验土壤中以获得甲霜灵浓度为 300 mg/kg 干土的土壤。在自然土壤和甲霜灵土壤中均匀加入 Pc2-3 和 Pc2 菌株的游动孢子液,获得 500 个游动孢子/g 干土的土壤,共计 4 个处理,土壤湿度为 20%,28℃ 下培养,0、5、10 和 20 d 后取样分析辣椒疫霉菌数量,以分析比较抗性菌株和敏感菌株在自然土壤和含有甲霜灵的土壤中适合度的差异性。

1.5 抗甲霜灵辣椒疫霉菌致病力测定

制备 Pc2-3 和 Pc2 菌株的游动孢子液,稀释至同一浓度后以 1:0、1:1 和 0:1 混合,分别均匀加入土壤中,使得土壤辣椒疫霉菌数量为 500 个游动孢子/g 干土,以不加孢子液土壤为对照。每一处理 40 kg 土壤,分装到 70 个盆钵中,每盆种植 1 颗辣椒苗,30 d 后统计发病率。将所有病株进行病原菌分离,并

分析各处理分离出的辣椒疫霉菌的抗性菌株比例。

2 结果和分析

2.1 抗甲霜灵辣椒疫霉菌的主要生物学特性研究

2.1.1 抗甲霜灵辣椒疫霉菌孢子囊产生、释放游动孢子和游动孢子萌发特性: 图 1-A 为抗甲霜灵辣椒疫霉菌株 Pc2-3 的孢子囊产生时间动态图。由图可知,Pc2-3 孢子囊产生速率明显小于 Pc2,2 d 后 2 个菌株的孢子囊产生基本完全,此时 Pc2-3 和 Pc2 的孢子囊数量分别为 0.59×10^4 和 1.32×10^4 个孢子囊/8 mm 菌丝块,可见 Pc2-3 产孢子囊能力弱于 Pc2。此外,图 1-B 显示出 Pc2-3 的孢子囊释放速率显著小于 Pc2,Pc2 孢子囊释放迅速,20 min 后释放率为 57.0%,2 h 后接近 100%,而 Pc2-3 释放缓慢,24 h 后仅为 8.7%。图 1-C 显示出 Pc2-3 游动孢子萌发率也显著小于 Pc2,室内 28℃ 培养 8 h 后,Pc2-3 和 Pc2 游动孢子萌发率分别为 37.3% 和 69.0%,前者仅为后者的 0.54 倍。由此可见,抗甲霜灵辣椒疫霉菌的孢子囊产生量、释放游动孢子速率和游动孢子萌发速率与敏感菌株存在较大差异。

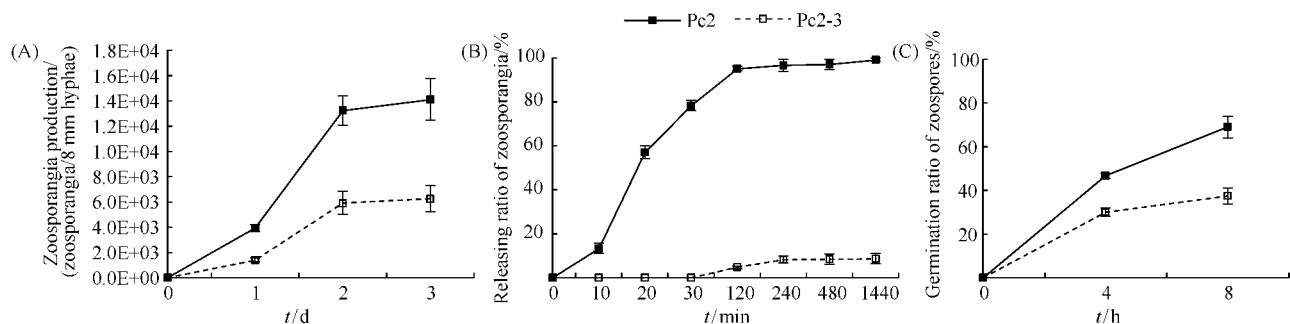


图 1. Pc2-3 和 Pc2 孢子囊产生 (A)、释放游动孢子 (B) 及游动孢子萌发 (C) 时间动态

Figure 1. The dynamic of zoosporangia production (A), zoospore release (B) and zoospore germination (C) of Pc2-3 and Pc2.

2.1.2 抗甲霜灵辣椒疫霉菌的生长温度及生长初始 pH 特性: 在 CA 平板条件下,抗甲霜灵辣椒疫霉菌株 Pc2-3 在不同温度及初始 pH 下生长 4 d 后的菌落直径见图 2。根据菌落直径和菌丝茂盛程度得知,Pc2-3 和 Pc2 温度生长曲线趋势基本一致,两者可生长温度范围均为 10–35℃,最适生长温度范围为 25–33℃。初始 pH 生长曲线趋势显示,初始 pH 在 3–11 范围内,两者均可生长;初始 pH 9–10 时,2 个菌株的菌落直径较大但菌丝稀疏,因此 Pc2-3 和

Pc2 较适宜生长的初始 pH 为 5–8。另外,Pc2 最适生长初始 pH 为 8,而 Pc2-3 最适生长初始 pH 为 6,两者有明显差别。总体而言,在可生长初始 pH 和温度范围内,Pc2-3 菌丝生长速率均小于 Pc2。可见,抗甲霜灵辣椒疫霉菌在抗性突变的同时可能会伴随着菌丝生长速率的突变。

2.2 抗性菌株与敏感菌株在平板上的生长竞争研究

将 Pc2-3 和 Pc2 的游动孢子以不同数量比例混

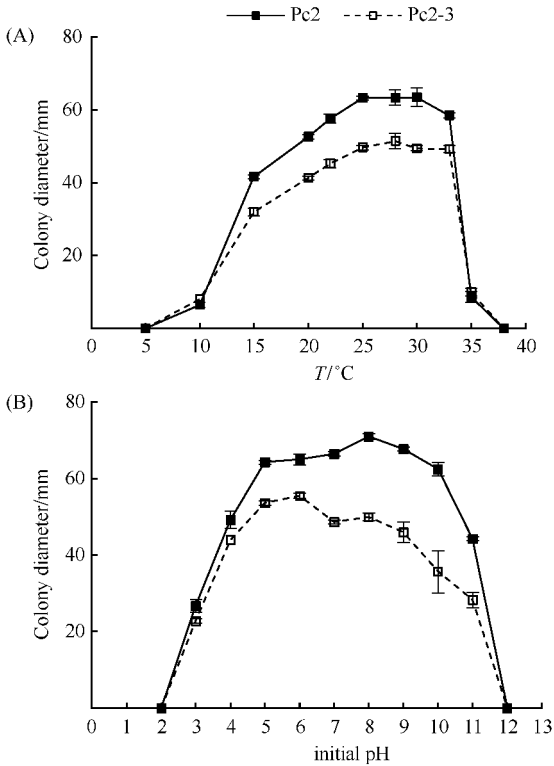


图 2. Pc2-3 和 Pc2 在不同温度 (A) 和 pH (B) 下培养 4 d 后的菌落直径

Figure 2. The colony diameter of Pc2-3 and Pc2 after 4 d of culture at different temperatures (A) and pH (B).

合接种在 CA 平板上, 在 28°C 下培养 40 h 后, Pc2-3 和 Pc2 游动孢子以 1:4、1:1 和 4:1 比例混合的处理组, 平板上长出的单菌落均对甲霜灵敏感。可见, Pc2-3 平板生长竞争能力明显弱于 Pc2。根据 2 个菌株游动孢子萌发速率研究结果, 可能是因为 Pc2-3 游动孢子萌发速率慢于 Pc2, 而 Pc2 孢子萌发后迅速生长, 在营养和空间上占据优势使得 Pc2-3 游动孢子的萌发和菌丝生长受到抑制。

表 1. Pc2-3 和 Pc2 平板生长竞争

Table 1. Growth competition between Pc2-3 and Pc2 on plate

| The starting proportion of zoospores (Pc2-3: Pc2) | The proportion of <i>P. capsici</i> strains after 60 h of culture (resistant isolates: sensitive isolates) |
|---|--|
| 0:1 | 0:30 |
| 1:4 | 0:30 |
| 1:1 | 0:30 |
| 4:1 | 0:30 |
| 1:0 | 30:0 |

2.3 抗甲霜灵辣椒疫霉菌的土壤适合度研究

2.3.1 抗甲霜灵辣椒疫霉菌在不同温度和湿度土壤中的数量变化: 图 3-A 为不同土壤温度下 Pc2-3 和 Pc2 在土壤中的消长动态。分析比较 3 种土壤温度下辣椒疫霉数量变化趋势可知, Pc2-3 和 Pc2 数量在不同土壤温度下呈现不同幅度的下降趋势。5°C 土壤温度较利于 Pc2-3 和 Pc2 的存活, 土壤温度为 25°C 和 35°C 时 Pc2-3 和 Pc2 数量降幅较大, 25°C 较 35°C 略适于 2 个菌株存活。3 种土壤温度下, Pc2-3 的土壤适合度都弱于 Pc2, 尤其是 5°C 条件下, 20 d 后 Pc2-3 辣椒疫霉数量仅是 Pc2 的 0.18 倍, 而 25°C 和 35°C 下倍数分别为 0.60 和 0.65。本试验结果也在一定程度上解释了辣椒疫霉在冬季能在土壤存活至下一年。

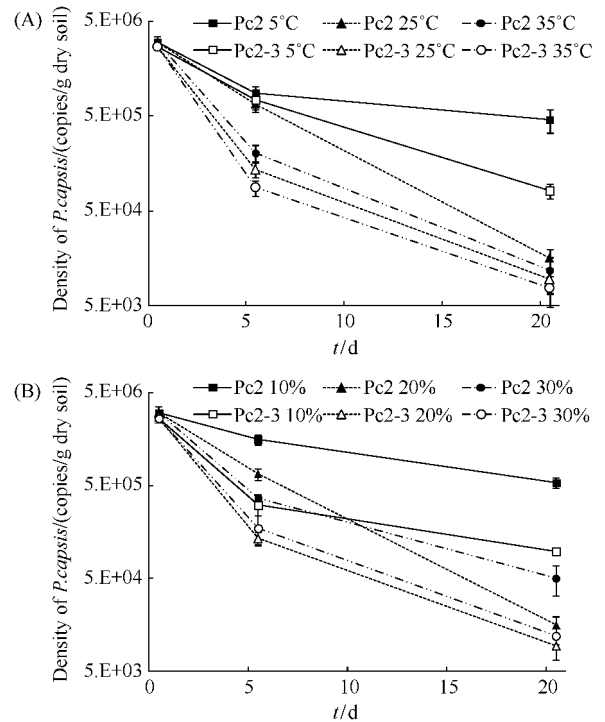


图 3. 不同温度 (A) 和湿度 (B) 土壤下 Pc2-3 和 Pc2 的土壤消长动态

Figure 3. The population dynamics of Pc2-3 and Pc2 in soil at different soil temperature (A) and humidity (B).

图 3-B 为不同土壤湿度下 Pc2-3 和 Pc2 在土壤中的消长动态趋势。与土壤温度相似, Pc2-3 和 Pc2 的数量在不同土壤湿度下呈现不同幅度的下降趋势。10% 土壤含水量较利于 Pc2-3 和 Pc2 的存活, 其次是 30%, 最后是 20%。20 d 后 3 种土壤湿度下, Pc2-3 数量都小于 Pc2, 尤其是在 10% 和 30% 条

件下。10%、20% 和 30% 的土壤含水量下, Pc2-3 辣椒疫霉数量分别是 Pc2 的 0.19、0.60 和 0.24 倍。10% 土壤含水量条件下的 Pc2-3 和 Pc2 的存活率高于 20% 和 30%, 我们推测这可能是因为在土壤湿度下辣椒疫霉游动孢子易转化为休止孢, 而休止孢生存力较强^[15], 从而导致存活率反而高于 20% 和 30%。

2.3.2 在自然土壤和含有甲霜灵的土壤中数量变化: 如图 4 所示, 定量 PCR 检测结果显示, 在自然土壤中, 随着培养时间的延长, Pc2-3 和 Pc2 的数量均呈下降趋势, Pc2-3 下降幅度大于 Pc2, 第 20 天时土壤中 Pc2-3 的数量是 Pc2 的 0.28 倍。在甲霜灵浓度为 300 mg/kg 干土的土壤中, Pc2-3 和 Pc2 的数量变化也呈现与自然土壤相同的趋势, 第 20 天时土壤中 Pc2-3 的数量是 Pc2 的 0.42 倍。可见, 在自然土壤和甲霜灵浓度为 300 mg/kg 干土的土壤中 Pc2-3 适应性均弱于 Pc2。此外, 分析比较自然土壤和甲霜灵土壤中 2 个菌株的数量变化可知, 甲霜灵土壤中的 Pc2-3 和 Pc2 数量下降幅度均小于自然土壤。第 20 天时, 甲霜灵土壤中的 Pc2-3 和 Pc2 数量分别是对应自然土壤的 5.31 和 3.53 倍, 这显示出土壤含有 300 mg/kg 干土的甲霜灵不仅利于 Pc2-3 的存活, 却也利于 Pc2 的存活。这种现象可能与甲霜灵也对土壤中其它微生物产生了较大影响有关。另外, 甲霜灵存在下 Pc2-3 存活率效果强于 Pc2, 这应该与 Pc2-3 具有甲霜灵抗性有关。

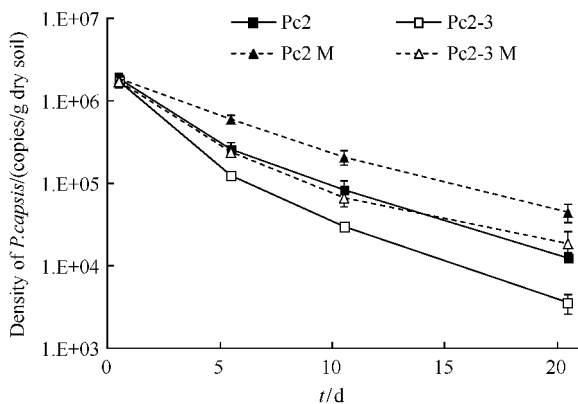


图 4. 自然土壤和含有甲霜灵的土壤中 Pc2-3 和 Pc2 的土壤消长动态

Figure 4. The population dynamics of Pc2-3 and Pc2 in soil with and without metalaxyl. Pc2-3 and Pc2 stand for soil without metalaxyl. Pc2-3 M and Pc2 M stand for the metalaxyl concentration in the soil was 300 mg/kg dry soil.

2.4 抗甲霜灵辣椒疫霉菌致病力研究

盆栽试验显示, 在辣椒移栽 30 d 后, 接种甲霜灵抗性菌株和敏感菌株的辣椒发病率呈现显著性差异。接种 Pc2-3 和 Pc2 游动孢子的土壤辣椒发病率分别为 14.3% 和 88.6%。可见, 抗性菌株 Pc2-3 的致病力明显弱于敏感菌株 Pc2。两者游动孢子 1:1 混合加入土壤后, 其盆栽发病率为 75.7%, 略低于 Pc2, 却显著高于 Pc2-3。将各处理病株分离的辣椒疫霉菌株进行甲霜灵敏感性测试, 结果显示, Pc2-3 处理分离出的 9 株辣椒疫霉菌均为甲霜灵抗性菌株, Pc2 处理分离得到的 42 株辣椒疫霉菌则均对甲霜灵敏感, 这符合科赫氏法则, 也显示出该抗性菌株在环境中的抗药性遗传稳定性。混合孢子液处理病株分离得到的 31 株辣椒疫霉菌均为甲霜灵敏感菌株。据此可知, 在混合孢子液土壤中, 起主要致病作用的是敏感菌株 Pc2, 换言之, 敏感菌株 Pc2 的致病力显著强于抗性菌株 Pc2-3。此外, 该数据与发病率数据相符, 即接种混合孢子液处理发病率接近 Pc2 处理, 而与 Pc2-3 处理差异较大。辣椒疫霉的土壤定殖和根系定殖能力是影响其致病的主要因素, 当等量的 Pc2-3 和 Pc2 同时存在于土壤时 Pc2 起主要致病作用, 所以推测抗性菌株的土壤定殖和根系定殖能力显著弱于敏感菌株, 这在一定程度上显示了抗性菌株的环境适合度弱于敏感菌株。另外, 该推断与上文相吻合, 即 Pc2-3 土壤适合度弱于 Pc2。

表 2. 盆栽条件下接种 Pc2-3 和 Pc2 辣椒的发病率及病株分离到的辣椒疫霉甲霜灵抗性分析

Table 2. The disease incidence of pepper plant growing in pot soil inoculated with Pc2-3 and Pc2 and the sensitivity to metalaxyl of *P. capsici* strains isolated from diseased plants

| The proportion of zoospores in soil (Pc2-3:Pc2) | Disease incidence/% | The proportion of <i>P. capsici</i> strains (resistant isolates: sensitive isolates) |
|---|---------------------|--|
| 1:0 | 14.3 | 9:0 |
| 1:1 | 75.7 | 0:31 |
| 0:1 | 88.6 | 0:42 |

3 讨论

辣椒疫霉主要以游动孢子的形式侵入植株根部, 在病株组织大量繁殖并能在病株残体中长期存

活。另外,辣椒疫霉通过产生孢子囊释放出游动孢子,因此孢子囊产生量、释放游动孢子速率和游动孢子萌发速率是其环境适合度及侵染能力的重要指标。此外,通过测定生长温度和 pH 范围及生长竞争能力可以更好的了解其环境适应性。本研究中抗性菌株的孢子囊产生量、孢子囊释放率和游动孢子萌发率等性状显著弱于敏感型菌株,这有别于 Bower^[12] 和威仁德^[13] 的研究结果,但也有报道显示致病疫霉、恶疫霉和大雄疫霉等抗甲霜灵突变株产孢子囊能力比敏感菌株下降^[8, 17]。本研究中抗性菌株和敏感生长 pH 范围、生长温度范围和最适生长温度基本一致,仅最适生长 pH 略有不同,但总体而言在可生长 pH 和温度范围内抗性菌株菌丝生长速率均低于敏感菌株,这与 Bruin 等^[18] 的报道相符。另外,我们在 CA 平板条件下测定了抗性菌株和敏感菌株的竞争能力,结果都显示两者同时存在于一个环境时,敏感菌株能迅速占领生存空间,即抗性菌株竞争能力极显著弱于敏感菌株。Pang 等^[19] 对抗丁吡吗啉辣椒疫霉菌进行了类似的研究,结果也显示抗性菌株竞争力弱于敏感菌株。辣椒疫霉通过侵染作物达到大量繁殖的目的,并且可在寄主组织中长期存活,因此致病力是辣椒疫霉在环境中生存的主要影响因子之一。盆栽试验数据显示,抗性菌株对辣椒植株的致病率是敏感菌株 0.16 倍。两者等量混合后的致病率接近敏感菌株致病率,且病株中分离出的辣椒疫霉菌株均无甲霜灵抗性。因此,抗性菌株的致病力明显弱于敏感菌株。

土壤是辣椒疫病病害循环中辣椒疫霉的主要生存环境,且疫病发生程度与土壤温度和湿度密切相关,因此研究自然土条件下抗性菌株和原始敏感菌株的土壤适合度及不同土壤温度和湿度对两者土壤适合度的影响有重要意义。结果表明,在自然土壤中抗性菌株适合度明显低于敏感菌株。另外,当土壤温度和湿度较适合辣椒疫霉存活时,抗性菌株的存活率显著低于敏感菌株,而土壤温度和湿度不利于辣椒疫霉存活时,抗性菌株的存活率略低于敏感菌株。可见,抗性菌株土壤适合度显著弱于敏感菌株。此外,我们也比较研究了在土壤含有甲霜灵条件下 2 个菌株的土壤适合度,结果显示,与自然土壤相比,土壤含有 300 mg/kg 干土的甲霜灵反而同时促进了抗性菌株和敏感菌株的存活,这可能是因为土壤结构复杂,土壤在此浓度下的甲霜灵对辣椒

疫霉抑制作用微弱,但可能显著抑制其它微生物生长进而促进了辣椒疫霉的存活。不容忽视的是在甲霜灵存在条件下,抗性菌株的存活率高于敏感菌株,这应该与抗性菌株对甲霜灵不敏感有一定的关联。

威仁德等^[13] 以生物学特性、寄主范围及对果实致病力等为依据推测出无论是田间自然产生还是室内诱变获得的抗甲霜灵辣椒疫霉菌株,其适生性与敏感菌株相似,在药剂选择压下很易发展为田间的优势群体,进而导致甲霜灵对辣椒疫病的防治失效。本文以室内药剂驯化获得的抗甲霜灵菌株为研究对象,研究了其与原始敏感菌株的主要生物学特性、竞争力、盆栽致病力和土壤适合度等环境适合度指标,结果都表明其环境适合度显著弱于敏感菌株。多项研究显示,室内诱变的抗性突变体虽然具有抗性,但适应性及致病力低于敏感型^[14, 20]。另外,田间抗性突变体已经历了一定的自然选择,因此田间抗性菌株与室内诱变产生的抗性菌株具有很大的差异性。所以本研究的抗性菌株并不能代表田间产生的抗性菌株,一些田间抗性菌株可能会具有等同敏感菌株的环境适合度。据遗传平衡理论,虽然会有突变体突变出类似于抗杀菌剂特性,但因为在既存环境条件下病原菌群落存在一个复杂平衡,平衡的多样性使得整个群落不会轻易向某一特性转变^[20-21]。所以无论田间抗性菌株是否具有有良好的适应性,在无药剂压力下是不易形成抗性群落的。环境适应性弱的抗性突变体在自然条件下本会自行消亡,但长期大量使用杀菌剂可能使得其得以存活和积累。环境适应性较强的抗性突变体在药剂选择下可能会繁殖积累形成抗性群落,从而导致杀菌剂防治失效。因此,在实践中我们需要严谨科学的使用杀菌剂以防止形成抗性群落,从而避免一些杀菌剂防治失效。例如,间断使用某类杀菌剂,结合其它非化学防治措施,交替使用不同类别的化学杀菌剂等等^[22]。

4 结论

本研究中,由室内药剂驯化获得的抗甲霜灵辣椒疫霉菌的环境适合度显著弱于原始敏感型菌株,这说明突变体可能在抗性突变的同时伴随着环境适应性的降低。田间抗性菌株和室内抗性菌株形成条件不同,所以该菌株可能并不能代表田间抗性菌株,也并不意味着田间抗性突变体环境适应性弱。田间

病原菌数量繁多且群落结构复杂, 适应性弱的抗性突变体可能在杀菌剂选择压下易存活, 而适应性较强的突变体则易形成优势群落。可见, 为防止抗性突变体在土壤中形成稳定的优势群落, 需要科学合理的使用化学杀菌剂。

参考文献

- [1] Lamour KH, Stam R, Jupe J, Huitema E. The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant Pathology*, 2012, 13: 329-337.
- [2] Wu Y, Lu S, Huang S, Fu G, Chen L, Xie D, Cen Z. Field resistance of *Phytophthora melonis* to metalaxyl in South China. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51 (8): 1078-1086. (in chinese)
吴永官, 陆少峰, 黄思良, 付岗, 陈亮, 谢大森, 黎起秦, 岑贞陆. 华南地区瓜类疫霉对甲霜灵的田间抗药性. 微生物学报, 2011, 51 (8): 1078-1086.
- [3] Qi R, Ding J, Gao Z, Ni C, Jiang J, Li P. Resistance of *phytophthora capsici* isolates to metalaxyl in Anhui Province. *Acta Phytophylacica Sinica*, 2008, 35 (3): 245-250. (in chinese)
戚仁德, 丁建成, 高智谋, 倪春耕, 蒋婧婧, 李萍. 安徽省辣椒疫霉对甲霜灵的抗药性监测. 植物保护学报, 2008, 35 (3): 245-250.
- [4] Pennisi AM, Agosteo GE. Insensitivity to metalaxyl among isolates of *Phytophthora capsici* causing root and crown rot of pepper in Southern Italy. *Plant Disease*, 1998, 82 (11): 1283.
- [5] Silvar C, Merino F, Díaz J. Diversity of *Phytophthora capsici* in Northwest Spain: Analysis of virulence, metalaxyl response, and molecular characterization. *Plant Disease*, 2006, 90: 1135-1142.
- [6] Qi R, Wang T, Zhao W, Li P, Ding J, Gao Z. Activity of ten fungicides against *Phytophthora capsici* isolates resistant to metalaxyl. *Journal of Phytopathology*, 2012, 160 (11-12): 717-722.
- [7] Gevens AJ, Donahoo RS, Lamour KH, Hausbeck MK. Characterization of *Phytophthora capsici* from Michigan surface irrigation water. *Phytopathology*, 2007, 97: 421-428.
- [8] Zheng X, Wang Y. Inheritance of the metalaxyl-resistant mutants of *Phytophthora cactorum*. *A Summary of Studies by Young Mycologists*, 1995, 113-117. (in chinese)
郑小波, 王源超. 恶霉菌抗甲霜灵突变株的遗传研究. 中青年菌物学家研究进展, 1995, 113-117.
- [9] Stack JP, Millar RL. Isolation and characterization of a metalaxyl-insensitive of *Phytophthora megasperma* f. sp. *medieaginis*. *Phytopathology*, 1985, 75 (12): 1387-1395.
- [10] Gisi U, Cohen Y. Resistance to phenylamide fungicides: A case study with *Phytophthora infestans* involving mating type and race structure. *Annual Review of Phytopathology*, 1996, 34: 549-572.
- [11] Holmes SJI, Channon AG. Studies on metalaxyl-resistant *Phytophthora infestans* in potato crops in south-west Scotland. *Plant Pathology*, 1984, 33: 347-54.
- [12] Bower LA, Coffey MD. Competitive fitness and survivability of metalaxyl-tolerant and phosphorous acid-tolerant isolates of *Phytophthora capsici* on green peppers and in soil. *Phytopathology*, 1985, 75 (11): 1330.
- [13] Qi R, Wang T, Gao Z, Li P, Ding J, Zhao W. Biological characteristics of metalaxyl-resistant isolates of *Phytophthora capsici*. *Acta Phytophylacica Sinica*, 2011, 38 (5): 449-454. (in chinese)
戚仁德, 汪涛, 高智谋, 李萍, 丁建成, 赵伟. 抗甲霜灵辣椒疫霉菌株的生物学特性. 植物保护学报, 2011, 38 (5): 449-454.
- [14] Brent KJ, Hollomon DW. Fungicide Resistance: the Assessment of Risk. FRAC Monograph No. 1. 2nd eds. Brussels: Croplife International, 2007: 1-48.
- [15] 郑小波. 疫霉菌及其研究技术. 北京: 中国农业出版社, 1997.
- [16] Wang Q, Ma Y, Wang G, Gu Z, Sun D, An X, Chang Z. Integration of biofumigation with antagonistic microorganism can control *Phytophthora* blight of pepper plants by regulating soil bacterial community structure. *European Journal of Soil Biology*, 2014, 61: 58-67.
- [17] Dowley LJ. Factors affecting the survival of metalaxyl-resistant strains of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in Ireland. *Potato Research*, 1987, 30 (3): 473-475.
- [18] Bruin GCA, Edington LV. Adaptive resistance in Peronosporales to metalaxyl. *Canada Journal of Plant Pathology*, 1981, 3: 201-206.
- [19] Pang Z, Shao J, Hu J, Chen L, Wang Z, Qin Z, Liu X. Competition between pyrimorph-sensitive and pyrimorph-resistant isolates of *Phytophthora capsici*. *Ecology and Epidemiology*, 2014, 104 (3): 269-274.
- [20] Dekker J. The fungicide-resistance problem. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 1977, 83 (suppl. 1): 159-167.

- [21] Ishii H, Udagawa H, Yanase H, Yamaguchi A. Resistance of *Venturia nashicola* to thiophanate-methyl and benomyl: build-up and decline of resistance in the field. *Plant Pathology*, 1985, 34(3) : 363 – 368.
- [22] Deising HB, Reimann S, Pascholati SF. Mechanisms and significance of fungicide resistance. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2008, 39: 286–295.

Environmental fitness of metalaxyl-resistant isolate of *Phytophthora capsici*

Guangfei Wang, Yan Ma*

Institute of Agricultural Resource and Environment, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] The environmental fitness of metalaxyl-resistant isolate of *Phytophthora capsici* was studied for assessing the risk of metalaxyl-resistant *P. capsici*. [Methods] We studied the main biological characteristics, competitive ability on plate, pathogenicity on pepper plant and adaptability in soil of the laboratory-induced metalaxyl-resistant isolate of *P. capsici* (Pc2-3 strain), with the metalaxyl-sensitive isolate (Pc2 strain, the wild-type) as the control. [Results] The zoosporangia production, releasing rate of zoosporangia and germination rate of zoospores of Pc2-3 were less than that of Pc2. The temperature range, optimum temperature range and initial pH range for mycelia growth of Pc2-3 were consistent with that of Pc2, but mycelia growth rate of Pc2-3 was lower than that of Pc2. Pc2-3 exhibited significantly weak competitive ability compared with Pc2 on carrots plate. Disease incidence of pepper inoculated with Pc2-3 (14.3%) was significantly lower than that of Pc2 (88.6%). When pepper plant was inoculated by mixtures of zoospore suspension of Pc2-3 and Pc2 at same ratio, the disease incidence, closing to that by Pc2 strain, was 75.7%. And all the strains isolated from diseased plants in the treatment were metalaxyl-sensitive. The density of *P. capsici* Pc2-3 was 0.28 times of Pc2 after the soil inoculated with Pc2-3 and Pc2 respectively at same zoospores density was incubated for 20 days. Otherwise, the ratio of Pc2-3 to Pc2 was 0.42 if the metalaxyl concentration in the soil was 300 mg/kg dry soil. No matter the soil temperature and humidity were beneficial to survival of *P. capsici* or not, Pc2-3 showed lower soil adaptability than Pc2. [Conclusion] The environmental fitness of metalaxyl-resistant *P. capsici* Pc2-3 was weaker than the metalaxyl-sensitive strain Pc2 (the wild-type).

Keywords: *Phytophthora capsici*, metalaxyl-resistance, environmental fitness

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest (201303023)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-25-84390248; E-mail: myjaas@sina.com

Received: 30 July 2014/Revised: 7 September 2014