

中国4省份葡萄霜霉病菌群体对烯酰吗啉的抗性及适合度

刘晓慧, 周连柱, 孔繁芳, 王忠跃, 黄晓庆*, 张昊*

(中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害综合治理全国重点实验室, 北京 100193)

摘要 为明确我国山西、山东、河北和云南省葡萄霜霉病菌对烯酰吗啉的抗性以及田间病菌群体的适合度,本研究采用 Taqman-MGB 技术检测了 2020 年—2021 年采自上述 4 省份 292 株葡萄霜霉病菌对烯酰吗啉的抗性频率;采用叶盘法测定了田间抗性菌株与敏感菌株的适合度。结果表明,上述 4 个地区的平均烯酰吗啉抗性频率及抗性等位基因频率分别为 64.0%和 74.7%,其中山东省蓬莱区最高(91.2%和 96.3%),河北省廊坊市(73.8%和 85.0%)和云南省宾川县(75.0%和 82.6%)次之,山西省清徐县(16.7%和 34.7%)最低。适合度分析发现,田间抗性菌株的产孢能力明显高于敏感菌株,但二者的复合适合度指数无显著差异。上述结果表明,4 省份霜霉病菌群体均对烯酰吗啉产生了不同程度的抗性,田间抗性菌株与敏感菌株相比无明显适合度变化。

关键词 葡萄霜霉病菌; 烯酰吗啉; 抗药性; 适合度

中图分类号: S 436.631.1 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2022161

Resistance of *Plasmopara viticola* populations to dimethomorph in four provinces, China and their fitness

LIU Xiaohui, ZHOU Lianzhu, KONG Fanfang, WANG Zhongyue, HUANG Xiaoqing*, ZHANG Hao*

(State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract In order to clarify the resistance of *Plasmopara viticola* field populations to dimethomorph in Shanxi, Shandong, Hebei and Yunnan provinces of China and their fitness, the dimethomorph-resistance of 292 *P. viticola* isolates collected from 2020 to 2021 was determined by Taqman-MGB real-time PCR, and the fitness of resistant and sensitive isolates was determined on detached leaves. The results showed that the average resistance frequency and resistance allele frequency of *P. viticola* from the four provinces were 64.0% and 74.7%, respectively. Among them, the average resistance frequency and resistance allele frequency in the populations of Penglai, Shandong province were the highest (91.2% and 96.3%), followed by those in Langfang of Hebei province (73.8% and 85.0%) and Binchuan of Yunnan province (75.0% and 82.6%), and the lowest was detected in Qingxu of Shanxi province (16.7% and 34.7%). The sporulation capacity of the resistant isolates was significantly higher than that of the sensitive ones, but there was no significant difference in the composite fitness index between them. The results indicated that the resistance of *P. viticola* populations to dimethomorph in the four provinces has developed to various degrees, but no significant difference existed in the fitness between sensitive and resistant isolates.

Key words *Plasmopara viticola*; dimethomorph; fungicide resistance; fitness

葡萄是一种营养价值很高的水果,在我国大部分地区均有种植^[1]。葡萄霜霉病作为葡萄上危害最

为严重的一种卵菌病害,具有很强的流行性^[2-3]。由于主栽葡萄品种对霜霉病菌缺乏抗性,在环境条件适

收稿日期: 2022-03-28

修订日期: 2022-06-25

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-29);国家自然科学基金(32001843)

* 通信作者 E-mail:黄晓庆 huangxiaoping0718@126.com;张昊 zhanghao@caas.cn

宜的情况下,葡萄霜霉病大面积发生,严重影响葡萄品质与产量^[4-5]。目前葡萄霜霉病的防治仍以化学防治为主^[6],生产上使用较多的药剂有甲霜灵、嘧菌酯、烯酰吗啉和霜脲氰等。但药剂的频繁使用易导致病原菌抗药性的产生和发展,增加防治难度和成本。

烯酰吗啉属于羧酸酰胺类杀菌剂^[5],主要通过干扰纤维素的生物合成,影响细胞壁的沉积,阻碍病菌孢子囊壁的形成^[7],对单轴霉属 *Plasmopara* 引起的霜霉病和疫霉菌 *Phytophthora* 引起的疫病具有很好的防治效果^[8]。自 1996 年在我国注册登记以来,广泛用于葡萄霜霉病的防治^[9]。2010 年, Sun 等^[10]测定了我国 7 省 11 个地区葡萄霜霉病菌 *Plasmopara viticola* 对烯酰吗啉的敏感性,发现所有菌株均表现敏感。但随着烯酰吗啉的大量、频繁使用,2014 年首次在我国广西资源县检测到了烯酰吗啉抗性葡萄霜霉菌株^[11]。2018 年,周连柱^[12]测定了我国 18 个葡萄主产区的葡萄霜霉病菌对烯酰吗啉的抗性,发现霜霉病菌对烯酰吗啉的整体抗性频率较低(37.2%),但不同地区间差异较大,河北省廊坊市等部分地区抗性频率较高,最高为 97.8%。

病原菌在田间能否形成稳定的抗性群体,受抗性菌株的生存适合度、杀菌剂选择压力以及环境条件等因素的影响^[13-14]。Corio-Costet 等^[15]发现,对甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂(Quinone outside inhibitor, QoI)敏感及抗性的葡萄霜霉病菌,在无药剂选择压条件下,二者的适合度无显著差异,具有相当的生存竞争力。王文桥等^[14]发现,实验室条件下经紫外诱导获得的烯酰吗啉抗性突变体的适合度低于其原始敏感菌株,并且抗性菌株经继代培养后,其产孢量减少,适合度显著下降,生存竞争力下降。但目前田间葡萄霜霉病菌对烯酰吗啉抗性群体的适合度变化情况尚不明确。开展田间抗性菌株适合度研究对明确田间病原菌群体抗药性发展趋势及制定合理的抗药性治理策略具有重要意义。

我国不同地区气候条件差异较大,葡萄霜霉病发生情况也不同,导致地区间用药方案存在差异^[16]。山西省清徐县在葡萄成熟季节(7 月—9 月)降水集中,葡萄霜霉病发生较为严重,但当地整体用药水平较低,其中,烯酰吗啉用药历史较短,用药频率低,每个生长季节使用 1~2 次,病原菌抗药性频率较低^[9,17];山东烟台地区葡萄种植历史长,葡萄霜

霉病发生严重,每个生长季需要进行 10 多次的杀菌剂喷雾,其中烯酰吗啉用药频次高达 4~6 次^[6],存在较高的药剂选择压力^[9,18];河北廊坊、昌黎地区在葡萄霜霉病的防治过程中存在轻防重治的现象,每个生长季节使用烯酰吗啉 3~5 次,并存在缩短施药间隔期和增大用药量等现象,病菌对烯酰吗啉抗性较高^[9,19];云南宾川地区葡萄生长期长,防治霜霉病过程中存在连续单一使用烯酰吗啉的情况,每个生长季节使用次数 2~4 次,导致病菌对烯酰吗啉抗性日益严重^[9,20-22]。上述 4 省份是我国重要的葡萄种植区域,为进一步明确上述地区葡萄霜霉病菌对烯酰吗啉抗性频率以及田间抗性菌株适合度的变化,我们重点进行了以下两方面的研究:1) 测定不同葡萄产区霜霉病菌对烯酰吗啉的抗性;2) 分别测定抗性菌株和敏感菌株的侵染率、病斑面积和产孢能力 3 个适合度参数,比较两种病原菌群体的适合度差异。为杀菌剂的合理使用提供科学指导,为制定科学合理的葡萄霜霉病菌抗药性治理策略提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试菌株分别来自 2020 年和 2021 年从河北省廊坊市广阳区、山东省烟台市蓬莱区、山西省太原市清徐县和云南省大理市宾川县 4 个主要葡萄产区采集的霜霉病样。采样时尽量采集发病初期幼嫩叶片,确保霜霉病菌活力。每个产区选择 2~3 个自然村,每个自然村采集 50 个样品,每个采样点采集 3~5 片病叶,各取样点之间至少间隔 50 m 以上。将采集的病样进行保湿培养及病原菌的分离和纯化,共收集到 292 株葡萄霜霉病菌。

供试葡萄品种为‘里扎马特’,采自中国农业科学院植物保护研究所廊坊中试基地葡萄园。

供试培养基为 1% 水琼脂培养基(1%WA)。

1.2 试验方法

1.2.1 葡萄霜霉病菌的纯化与扩繁

将采集的病叶用灭菌水淋洗 3~4 遍,去除表面杂质,用剪刀剪去叶缘枯黄组织,将病叶背面向上放置于放有两层湿滤纸的培养皿中,在病叶和培养皿内喷水保湿,放于温度 21℃、相对湿度 100%、L/D=16 h//8 h 的人工气候培养箱中培养 3 d 左右,待其长出新鲜霉层。

采集‘里扎马特’当年生副梢顶端第4~5片健康嫩叶作为葡萄霜霉病菌的接种材料。将上述叶片用清水冲净表面尘土,使用1%次氯酸钠消毒30 s后用无菌水浸泡2~3次,用无菌吸水纸吸干表面液体后,使用灭菌打孔器打制成直径1.5 cm的叶盘。将叶盘背面向上置于1% WA培养基上,每皿10个叶盘。挑取培养出的单个霜霉病菌斑,配制成浓度为 1×10^6 个/mL孢子悬浮液,每叶盘接种20 μ L,放于温度21℃、相对湿度100%、L//D=16 h//8 h的人工气候培养箱中培养。

1.2.2 葡萄霜霉病菌的DNA提取

使用OMAGE公司生产的真菌DNA试剂盒(D3390-02)提取带菌叶盘的DNA,首先向装有带菌叶盘的冻存管中加入800 μ L Buffer FG1,放入液体研磨仪中研磨2 min,确保组织充分破碎,然后按照试剂盒步骤提取。

1.2.3 葡萄霜霉病菌对烯酰吗啉抗药性检测

采用王喜娜^[11]建立的Taqman-MGB分子检测技术检测葡萄霜霉病菌对烯酰吗啉抗性。利用核酸浓度测定仪(Nano Vue Plus)对所提取DNA进行浓度测定,选择质量较高的样品。使用引物Cesa3F(5'-GCACAAACACGACAATGTAGACAA-3')和Cesa3R(5'-CGGCTGCTACCTTTACGGCAA-3'),探针Cesa3pR(5'-FAM-AGCAACGAGCTGAA-MGB-3')和Cesa3pS(5'-VIC-CAGCAACGAGCCGA-MGB-3')进行荧光定量PCR扩增。试验选取抗性、敏感菌株的DNA和ddH₂O分别作为阳性、阴性和空白对照。由于葡萄霜霉病菌对烯酰吗啉的抗性是由隐性等位基因控制,只有当该基因位点的两个等位基因均发生了纯合突变时,病原菌才表现为抗性。因而,当菌株仅具有敏感探针Cesa3pS扩增曲线而无抗性探针Cesa3pR扩增曲线时,则判定该菌株为敏感纯合子;当菌株同时具有敏感探针Cesa3pS和抗性探针Cesa3pR扩增曲线时,则判定该菌株为敏感杂合子;当菌株仅具有抗性探针Cesa3pR扩增曲线时,则判定该菌株为抗性菌株。根据检测结果统计病原菌群体的抗性频率和抗性等位基因频率,进而分析病原菌的抗性情况及抗性发展趋势。其中,抗性频率=抗性菌株数/总菌株数 $\times 100\%$;抗性等位基因频率=(抗性菌株数 $\times 2$ +敏感杂合菌株数)/总菌株数 $\times 100\%$ 。

1.2.4 葡萄霜霉病菌抗烯酰吗啉菌株适合度测定

采用叶盘法^[23-25]测定葡萄霜霉病菌对烯酰吗啉抗性菌株及敏感菌株的侵染率(infection frequency)、病斑面积(lesion area)和产孢能力(sporulation capacity)3个参数,以评估其复合适合度指数(composite fitness index)^[26]。将135个烯酰吗啉抗性菌株及121个敏感菌株的孢子囊悬浮液(1×10^5 个/mL)分别接种到离体葡萄叶盘背面,每个叶盘上接种20 μ L菌液,每皿放置10个叶盘,每菌株设置3个重复,每菌株共接种30个叶盘。置于培养箱中黑暗处理24 h后,用灭菌滤纸条将叶盘表面残余液滴吸去,将平板放于温度21℃、L//D=16 h//8 h、相对湿度100%的人工气候培养箱中培养,7 d后调查。

侵染率(%)为发病叶盘数占总叶盘数的比率;病斑面积(cm^2 /叶)为每菌株在叶盘上的发病面积;产孢能力(个/ $\text{cm}^2 \cdot \text{mL}$)为单位体积下每单位面积产生的孢子囊数量;复合适合度指数=侵染率 $\times$ 病斑面积 $\times$ 产孢能力。

1.2.5 数据分析

利用Excel 2019对抗性频率、适合度数据进行整理,计算各产区葡萄霜霉病菌抗性频率及抗性位点基因频率,并结合Rstudio软件中fifer、tidyverse、RColorBrewer等软件包进行葡萄霜霉病菌对烯酰吗啉抗性频率及抗性位点基因频率的精确检验,利用GraphPad 5.0绘图软件对抗性频率及抗性位点基因频率数据进行作图;利用SPSS 25.0统计软件对适合度数据进行 t 检验,比较是否存在显著性差异,利用GraphPad 5.0绘图软件对抗性菌株、敏感菌株的侵染率、病斑面积和产孢能力数据进行作图、利用R语言4.2.0中tidyverse等软件包对复合适合度指数数据进行作图。

2 结果与分析

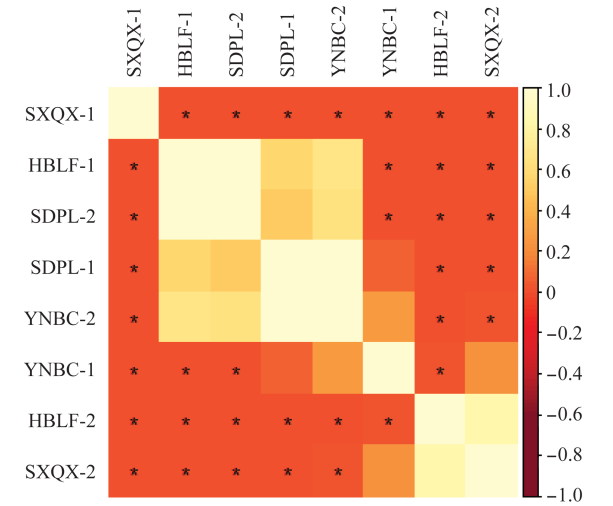
2.1 葡萄霜霉病菌对烯酰吗啉的抗性情况

2020年和2021年采自我国河北省廊坊市、山东省蓬莱区、山西省清徐县和云南省宾川县4个地区的292株葡萄霜霉病菌对烯酰吗啉的整体抗性频率达到64.0%,2020年和2021年采集菌株的抗性频率分别为62.6%和67.0%(表1)。其中,2020年河北省廊坊市葡萄霜霉病菌抗性频率最高,达到93.9%,山西省清徐县葡萄霜霉病菌抗性频率显著

低于其他 3 个地区,仅为 3.8%;2021 年山东省蓬莱区葡萄霜霉病菌抗性频率高达 96.0%,山西省清徐县(50%)和河北省廊坊市(41.9%)抗性频率显著低于其他 2 个地区(图 1)。

表 1 2020 年—2021 年葡萄霜霉病菌对烯酰吗啉的抗性频率和抗性等位基因频率

采集地区 Collection site		菌株数/株		抗性菌株/株		抗性频率/%			抗性等位基因频率/%		
		Number of isolates		Resistant isolates		Resistance frequency			Resistance allele frequency		
		2020	2021	2020	2021	2020	2021	平均值 Mean	2020	2021	平均值 Mean
河北廊坊	Langfang, Hebei	49	31	46	13	93.9	41.9	73.8	89.6	77.4	85.0
山东蓬莱	Penglai, Shandong	43	25	38	24	88.7	96.0	91.2	95.3	98.0	96.3
山西清徐	Qingxu, Shanxi	52	20	2	10	3.8	50.0	16.7	24.0	62.5	34.7
云南宾川	Binchuan, Yunnan	54	18	38	16	70.4	88.9	75.0	77.8	97.2	82.6
总计	Total	198	94	124	63	62.6	67.0	64.0	70.5	83.5	74.7



SXQX-1和SXQX-2分别于2020年和2021年采自山西清徐; HBLF-1和HBLF-2分别于2020年和2021年采自河北廊坊; SDPL-1和SDPL-2分别于2020年和2021年采自山东蓬莱; YNBC-1和YNBC-2分别于2020年和2021年采自云南宾川。*表示经卡方分割检验差异显著($\alpha=0.05$)。-1~1表示相关性系数。下同。
SXQX-1 and SXQX-2 were collected from Qingxu county of Shanxi province in 2020 and 2021; HBLF-1 and HBLF-2 were collected from Langfang city of Hebei province in 2020 and 2021; SDPL-1 and SDPL-2 were collected from Penglai county of Shandong province in 2020 and 2021; YNBC-1 and YNBC-2 were collected from Binchuan county of Yunnan province in 2020 and 2021. * indicates significant difference based on the chi-square segmentation test result ($\alpha=0.05$). -1~1 indicates correlation coefficient. The same applies below.

图 1 2020 年和 2021 年葡萄霜霉病菌群体对烯酰吗啉抗性频率

Fig. 1 The dimethomorph-resistance frequencies of *Plasmopara viticola* populations in 2020 and 2021

292 株葡萄霜霉病菌对烯酰吗啉整体抗性等位基因频率为 74.7%,2020 年和 2021 年整体抗性等位基因频率分别为 70.5%和 83.5%(表 1),其中 2020 年山东省蓬莱区病菌抗性等位基因频率高达 95.3%,山西省清徐县病菌抗性等位基因频率为 24.0%,显著低于其他 3 个地区(图 2);2021 年山东省蓬莱区和云南省宾川县抗性等位基因均超过

95%,河北省廊坊市次之(77.4%),山西省清徐县最低(62.5%)。

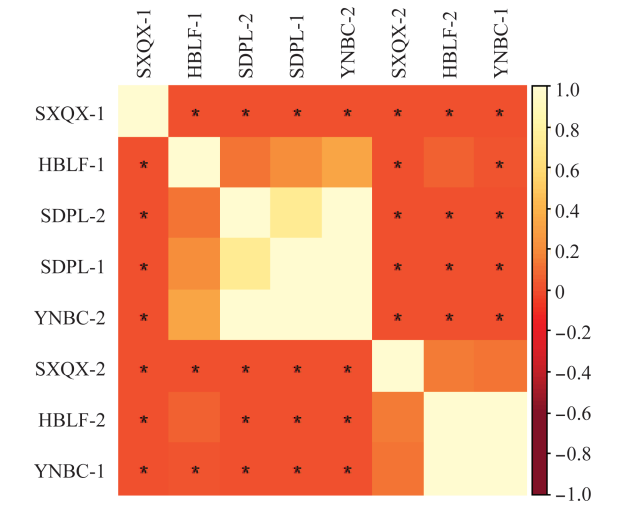


图 2 2020 年和 2021 年葡萄霜霉病菌对烯酰吗啉抗性等位基因频率

Fig. 2 The dimethomorph-resistance allele frequencies of *Plasmopara viticola* populations in 2020 and 2021

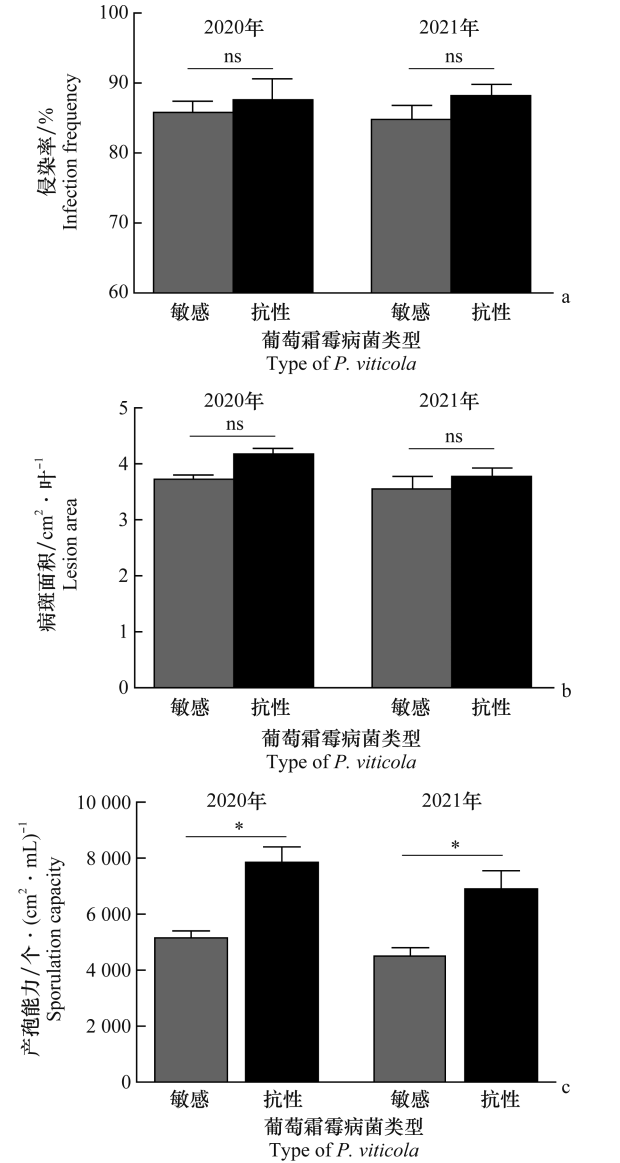
与 2020 年相比,2021 年各地区的抗药性发生情况不同。2021 年山西省清徐县葡萄霜霉病菌对烯酰吗啉的抗性频率明显升高,河北省廊坊市显著降低($P<0.05$);而对于抗性等位基因频率,2021 年山西省清徐县及云南省宾川县均明显升高($P<0.05$),其他无显著变化($P>0.05$)。

2.2 葡萄霜霉病菌抗烯酰吗啉菌株的适合度

采用叶盘法测定 292 株葡萄霜霉病菌的侵染率、病斑面积和产孢能力 3 个适合度指标过程中,36 株葡萄霜霉病菌被污染,最终得到烯酰吗啉抗性菌株 135 株和敏感菌株 121 株。

侵染率测定结果(图 3a)显示,2020 年和 2021

年抗性菌株的侵染率均值分别为 $(88\pm 16)\%$ 和 $(88\pm 14)\%$,敏感菌株的侵染率均值分别为 $(86\pm 18)\%$ 和 $(85\pm 19)\%$,抗性菌株与敏感菌株侵染率均无显著差异($P>0.05$)。病斑面积测定结果(图 3b)显示,2020 年和 2021 年的抗性菌株引起的病斑面积分别为 $(4.16\pm 0.8)\text{cm}^2/\text{叶}$ 和 $(3.76\pm 1.22)\text{cm}^2/\text{叶}$,而敏感菌株引起的病斑面积分别为 $(3.72\pm 0.72)\text{cm}^2/\text{叶}$ 和 $(3.55\pm 1.26)\text{cm}^2/\text{叶}$,抗性菌株和敏感菌株两年的病斑面积相当($P>0.05$)。产孢能力测定结果(图 3c)显示,培养 7 d 后,抗性菌株和敏



ns和*表示经t测验敏感菌株和抗性菌株在0.05水平无显著差异和有显著差异。
ns and * indicate insignificant and significant difference between sensitive and resistant isolates at 0.05 level by t-test.

图 3 葡萄霜霉病菌敏感菌株和抗烯酰吗啉菌株适合度指标
Fig. 3 The fitness index of dimethomorph-sensitive and dimethomorph-resistant *Plasmopara viticola* isolates

感菌株的孢子萌发率均达到 100%,其中 2020 年和 2021 年抗性菌株的产孢能力分别为 $(7\ 819\pm 4\ 821)$ 个/ $(\text{cm}^2 \cdot \text{mL})$ 和 $(6\ 906\pm 5\ 107)$ 个/ $(\text{cm}^2 \cdot \text{mL})$,敏感菌株的产孢能力 $(5\ 133\pm 2\ 327)$ 个/ $(\text{cm}^2 \cdot \text{mL})$ 和 $(4\ 482\pm 1\ 679)$ 个/ $(\text{cm}^2 \cdot \text{mL})$,抗性菌株两年的产孢量均显著高于敏感菌株($P<0.05$),表明抗性菌株具有较强的产孢能力。

根据以上 3 个参数,按照 Tooley 等^[26]建立的公式分别计算出每个菌株的复合适合度指数(图 4)。结果显示,2020 年和 2021 年抗性菌株的复合适合度指数分别为 $(27\ 385\pm 18\ 357)$ 和 $(17\ 354\pm 9\ 524)$,2020 年和 2021 年敏感菌株的复合适合度指数分别为 $(18\ 000\pm 9\ 803)$ 和 $(11\ 131\pm 7\ 737)$,两年抗性菌株和敏感菌株的复合适合度指数均变化不大($P>0.05$),表明烯酰吗啉抗性菌株与敏感菌株之间没有明显的适合度差异。

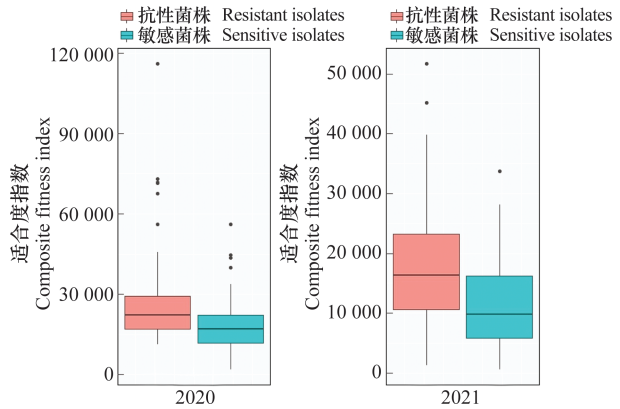


图 4 121 个敏感菌株(蓝色)和 135 个抗性菌株(橙色)的复合适合度指数
Fig. 4 Composite fitness index of 121 sensitive (blue) and 135 resistant isolates (orange) of *Plasmopara viticola*

3 结论与讨论

葡萄霜霉病在世界主要葡萄产区严重发生^[27]。该病流行性极强,一旦暴发,所造成的损失惨重^[16],严重影响着葡萄质量和产量的提升。化学防治因具见效快、效果好的优点,成为病害防治过程中必不可少的防控手段。大量内吸性杀菌剂,如甲霜灵、啞菌酯、烯酰吗啉^[28-29]等虽具有较好的防治效果,但药剂的大量频繁使用加速了病原菌抗药性的产生和发展,使葡萄生产蒙受了重大损失^[9-12]。烯酰吗啉因对葡萄霜霉病具有很好的防治效果,且与甲霜

灵等苯基酰胺类杀菌剂不存在交互抗性,近些年在生产上广泛使用^[5],葡萄霜霉病菌对其抗性发展迅速^[9,30]。

研究发现,葡萄霜霉病菌对羧酸酰胺类杀菌剂的抗性与其纤维素合酶第 1 105 位的两个 SNP 突变(G1105S 和 G1105V)有关^[8,31]。但 G1105V 突变仅在世界上的少数几个地点被检测到,并且抗性频率很低,欧洲大部分地区及日本等主要以 G1105S 为主,目前在我国也仅检测到了 G1105S 突变^[9,30]。基于这一原理,王喜娜等^[11]建立了快速检测葡萄霜霉病菌对烯酰吗啉抗性的 Taqman-MGB 分子检测技术,该技术比叶盘法更为简便、精确,显著缩短了检测时间,提高了检测精度,为田间葡萄霜霉病菌对烯酰吗啉抗性的快速检测及监测提供了技术保障。

本研究发现,我国山西、河北、山东、云南省 4 个地区均检测到了葡萄霜霉病菌烯酰吗啉抗性菌株。其中,山东省蓬莱区、河北省廊坊市和云南省宾川县的菌株对烯酰吗啉抗性较为严重(两年的平均抗性频率均在 70% 以上),而山西清徐县的抗性频率较低(16.7%),这可能与不同地区每个生长季节烯酰吗啉的用药次数及用药量等密切相关^[9]。Huang 等^[9]调查发现 2014 年—2016 年山西省清徐县每个生长季节用药次数为 1~2 次,总用药量为 0.03~0.06 kg/hm²,用药频次和用药量均较少;而山东省蓬莱区、河北省廊坊市和云南省宾川县每个葡萄生长季烯酰吗啉用药次数较高(3~5 次),平均用药量超过 1 kg/hm²,高于烯酰吗啉防治葡萄霜霉病的推荐剂量(0.3~0.5 kg/hm²),长期大量、频繁的药剂使用可能导致病原菌产生了抗性,并且伴随着抗药性的产生,种植户为了达到良好的防治效果只得增加用药量,从而加剧了上述地区霜霉病菌抗药性的发展。与周连柱 2018 年对上述 4 个地区葡萄霜霉病菌烯酰吗啉的抗性检测结果相比,山东省蓬莱区、山西省清徐县和云南省宾川县三地区葡萄霜霉病菌的烯酰吗啉抗性频率和抗性位点基因频率均呈现上升趋势,导致该结果的原因可能是检测地区近两年葡萄生长季节平均降雨量较常年偏多 10.3%~35%^[32-33],葡萄霜霉病发生较为严重,从而导致各产区杀菌剂的使用量随之增加。虽然山西省清徐县菌株抗性频率较低,但抗性位点基因频率呈逐年上升趋势,表明病原菌具有一定的抗性发展趋势,生产上

应注意药剂的合理使用。另外,病原菌抗药性的产生会引起药效下降^[34],具体药剂的防治效果需进一步评估,从而为田间精准用药及制定更科学的抗性治理对策提供依据。

同时,明确无药剂选择压力下葡萄霜霉病菌抗性菌株与敏感菌株适合度变化状况,对制定科学的抗药性治理方案也至关重要。本研究选择测定了采自我国山西省清徐县、云南省宾川县、山东省蓬莱区及河北廊坊市 4 个不同葡萄产区的 256 个田间菌株中对烯酰吗啉敏感菌株与抗性菌株在无药条件下的侵染率、病斑面积和产孢能力,发现抗性菌株的侵染率、病斑面积与敏感菌株不存在显著差异($P>0.05$),而产孢能力显著高于敏感菌株($P<0.05$),生存繁殖能力较强。此外,还发现抗性菌株的复合适合度指数高于敏感菌株,但两者无显著差异($P>0.05$),该结果与 Blum^[35]的研究结果一致,原因可能是自然选择导致适合度显著下降的抗性菌株被淘汰,从而使两类菌株表现出适合度相当的状况。另外,通过连续两年适合度分析,发现侵染率、病斑面积和产孢能力变化趋稳,可能是由于只有当葡萄霜霉病菌发生隐性纯合突变时才表现对烯酰吗啉的抗性,延缓了病菌对烯酰吗啉抗性的发展,导致短时间内病原菌群体抗药性及适合度无太大变化。但上述试验是在实验室条件下进行的,给予了病原菌较为适宜的温度、湿度等生长环境,与田间自然条件下病菌的适合度反应有所差异,一定程度上该方法仍存在缺陷^[36]。为此,尚需进一步研究抗性菌株适合度的稳定性以及其与敏感菌株的竞争能力等,以制定更为科学、精准的抗药性治理策略。

综上所述,本研究明确了我国河北省廊坊市、山东省蓬莱区、山西省清徐县和云南省宾川县 4 个葡萄产区霜霉病菌对烯酰吗啉的抗性情况和适合度现状,为葡萄霜霉病的田间防治以及病原菌的抗药性治理提供了理论依据。结合国际杀菌剂抗性委员会 CAA 工作组的相关建议,对于山东省蓬莱区等抗性较严重的产区,应避免烯酰吗啉等羧酸酰胺类药剂单独使用,建议与霜脲氰、氰霜唑、氟吡菌胺·霜霉威等其他不同作用机制的药剂桶混使用^[37];在山西省清徐县等抗性较低的产区,应将羧酸酰胺类杀菌剂与不同作用机理的杀菌剂交替或混合使用,禁止羧酸酰胺类杀菌剂作铲除性使用,限制每个生长季使用羧酸酰胺类杀菌剂不超过 3 次,以避免抗药性

发展和扩散^[12,37]。

参考文献

- [1] WONG F P, BURR H N, WILCOX W F. Heterothallism in *Plasmopara viticola* [J]. Plant Pathology, 2001, 50(4): 427 - 432.
- [2] 叶正和, 王文相, 张爱芳, 等. 我国卵菌病害化学防治概况 [J]. 安徽农业科学, 2000, 28(4): 530 - 533.
- [3] 司乃国, 刘君丽, 马学明. 卵菌病害的化学防治现状与防治策略 [J]. 农药, 2000, 39(2): 7 - 10.
- [4] SPENCER-PHILIPS P T N, GISI U, LEBEDA A. Advances in downy mildew research [M]. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2002: 119 - 159.
- [5] 朱书生, 卢晓红, 陈磊, 等. 羧酸酰胺类(CAAs)杀菌剂研究进展 [J]. 农药学报, 2010, 12(1): 1 - 12.
- [6] 高琪, 李兴红, 刘梅, 等. 我国葡萄园病害发生危害及防治用药情况调查 [J]. 中国果树, 2021(9): 97 - 102.
- [7] FABRITIUS A L, JUDELSON H S. Mating-type loci segregate aberrantly in *Phytophthora infestans* but normally in *Phytophthora parasitica*: implications for models of mating-type determination [J]. Current Genetics, 1997, 32(1): 60 - 65.
- [8] BLUM M, WALDNER M, GISI U. A single point mutation in the novel *PvCesA3* gene confers resistance to the carboxylic acid amide fungicide mandipropamid in *Plasmopara viticola* [J]. Fungal Genetics and Biology, 2010, 47(6): 499 - 510.
- [9] HUANG Xiaoqing, WANG Xina, KONG Fanfang, et al. Detection and characterization of carboxylic acid amide-resistant *Plasmopara viticola* in China using a TaqMan-MGB real-time PCR [J]. Plant Disease, 2020, 104(9): 2338 - 2345.
- [10] SUN Haiyan, WANG Hancheng, STAMMLER G, et al. Sensitivity of Chinese isolates of *Plasmopara viticola* to metalaxyl and dimethomorph [J]. Journal of Phytopathology, 2010, 158(6): 450 - 452.
- [11] 王喜娜. 我国主要葡萄产区霜霉菌对烯酰吗啉和啮菌酯的抗药性分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2017.
- [12] 周连柱. 我国主要葡萄产区霜霉菌对五种主要杀菌剂的抗药性检测[D]. 北京: 中国农业科学院, 2019.
- [13] 刘召阳, 王帅, 高宇琪, 等. 2株不同地理来源的苹果树腐烂病菌对甾醇生物合成抑制剂类杀菌剂的交互抗药性及生物适合度分析 [J]. 西北林学院学报, 2020, 35(2): 119 - 124.
- [14] 王文桥, 刘国容, 张小风, 等. 葡萄霜霉病菌和马铃薯晚疫病病菌对三种杀菌剂的抗药性风险研究 [J]. 植物病理学报, 2000, 30(1): 48 - 52.
- [15] CORIO-COSTET M F, DUFOUR M C, CIGNA J, et al. Diversity and fitness of *Plasmopara viticola* isolates resistant to QoI fungicides [J]. European Journal of Plant Pathology, 2011, 129(2): 315 - 329.
- [16] 王忠跃. 中国葡萄病虫害与综合防控技术 [M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2010: 70.
- [17] 王喜娜, 王敏, 孔繁芳, 等. 山西省清徐县葡萄霜霉菌对烯酰吗啉的抗药性分析 [J]. 植物保护, 2018, 44(1): 139 - 142.
- [18] 李宝燕, 石洁, 宁爽, 等. 山东烟台葡萄霜霉菌对烯酰吗啉的抗药性分析 [J]. 中国果树, 2018(1): 67 - 69.
- [19] 刘秀香. 河北昌黎酿酒葡萄病虫害发生与防治 [J]. 现代农村科技, 2015(8): 28 - 29.
- [20] 刘彦均, 涂芥兵, 杨爱兵. 云南宾川葡萄产业现状、问题与发展建议 [J]. 农业工程技术, 2021, 41(14): 7.
- [21] 苏月. 宾川县葡萄产业发展现状及问题探析 [J]. 南方农业, 2019, 13(12): 115 - 117.
- [22] 杜飞, 缪钱江, 梅馨月, 等. 葡萄霜霉菌对主要杀菌剂的抗性监测 [C]//中国植物病理学会 2015 年学术年会论文集. 北京: 中国农业出版社, 2015: 92.
- [23] STAHL E-CSECH U, GISI U, SOZZI D. Determination of the sensitivity of *Plasmopara viticola* to phenylamides [J]. EPPO Bulletin, 2010, 22(2): 314 - 316.
- [24] 冯夏莲, 何承忠, 张志毅, 等. 植物遗传多样性研究方法概述 [J]. 西南林学院学报, 2006, 26(1): 69 - 74.
- [25] 赵美琦, 赵帧梅, 马占鸿, 等. 水稻稻瘟病品种-小种组合寄生适合度测定方法的研究 [J]. 中国农业大学学报, 1997, 2(5): 51 - 57.
- [26] TOOLEY P W, SWEIGARD J A, FRY W E. Fitness and virulence of *Phytophthora infestans* isolates from sexual and asexual populations [J]. Phytopathology, 1986, 76(11): 1209 - 1212.
- [27] 郭俊强, 张晓月, 王荣花, 等. 葡萄品种霜霉病抗性的田间自然鉴定 [J]. 西北农业学报, 2021, 30(6): 914 - 920.
- [28] TOFFOLATTI S L, VENTURINI G, CAMPPIA P, et al. Sensitivity to cymoxanil in Italian populations of *Plasmopara viticola* oospores [J]. Pest Management Science, 2015, 71(8): 1182 - 1188.
- [29] 黄云霄, 李敏, 潘学军, 等. 几种杀菌剂对葡萄霜霉病的防治效果 [J]. 农药, 2018, 57(11): 836 - 839.
- [30] ZHANG Hao, KONG Fanfang, WANG Xina, et al. Tetra-primer ARMS PCR for rapid detection and characterisation of *Plasmopara viticola* phenotypes resistant to carboxylic acid amide fungicides [J]. Pest Management Science, 2017, 73(8): 1655 - 1660.
- [31] AOKI O, KAWAGOE Y, FUJIMORI N, et al. Monitoring of a single point mutation in the *PvCesA3* allele conferring resistance to carboxylic acid amide fungicides in *Plasmopara viticola* populations in Yamanashi prefecture, Japan [J]. Plant Health Progress, 2015, 16(2): 84 - 87.
- [32] 佚名. 《2020 年中国气候公报》速览 [N/OL]. 中国气象报, 2021 - 02 - 10. DOI: 10.28122/n.cnki.ncqxb.2021.000182.
- [33] 王纯枝, 赵秀兰. 2021 年秋季气象条件对农业生产的影响评价 [J]. 中国农业气象, 2022, 43(3): 240 - 243.

3 结论与讨论

目前植物病毒的检测技术主要有生物学检测法^[12]、血清学检测法^[13-14]、电子显微镜技术^[15]、RT-PCR等。血清学检测方法具有操作简单、反应快速、灵敏度高和特异性强等优点,被广泛应用于植物病毒的检测,是一种重要的病毒检测技术^[16]。快速、准确、灵敏的检测手段对于病毒的检测和防控至关重要。

本研究克隆了 ASbLV 贵州分离物的 CP 基因,构建了 pET28a-ASbLV-CP 的原核表达载体, pET28a-ASbLV-CP 重组质粒转化大肠杆菌 Rosetta (DE3) 后,经 IPTG 诱导表达、纯化、透析、脱盐等步骤获得纯化的 ASbLV CP 蛋白,并以此为抗原制备了 ASbLV CP 的多克隆抗体,使用 Western blot 进行了多克隆抗体的效价检测,使用间接 ELISA 方法检测多克隆抗体特异性,结果表明该抗体的效价为 1:4 000 且特异性良好。鉴于 ASbLV 在我国各猕猴桃种植区广泛发生,严重制约我国猕猴桃产业的可持续发展,因此有必要对该病毒的发生情况进行监测和预警。目前,ASbLV 的检测方法主要是 RT-PCR,未见血清学检测的相关报道,因此建立快速可靠的血清学检测技术对 ASbLV 的检测和防治十分重要。本研究通过制备 ASbLV 外壳蛋白的多克隆抗体,建立了 ASbLV 的间接 EILSA 检测方法,该方法能够有效应用于大批量田间样品的 ASbLV 检测,为今后开展该病毒的检测和致病分子机理研究奠定基础。

参考文献

- [1] 方金豹,钟彩虹. 新中国果树科学研究 70 年——猕猴桃[J]. 果树学报, 2019, 36(10): 1352–1359.
 - [2] 王丽,周增强,侯琨,等. 我国猕猴桃细菌性溃疡病研究分析及防控[J]. 中国南方果树, 2017, 46(2): 178–182.
 - [3] ZHANG Guoding, BAI Bixin, XU Ming, et al. Advances in
-
- (上接 178 页)
- [34] 王文桥. 气传霜霉和疫霉对恶霜灵、烯酰吗啉和霜脲氰抗性风险研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2000.
 - [35] BLUM M, BOEHLER M, RANDALL E, et al. Mandipropamid targets the cellulose synthase-like *PiCesA3* to inhibit cell wall biosynthesis in the oomycete plant pathogen, *Phytophthora infestans* [J]. Molecular Plant Pathology, 2010, 11(2): 227–243.
 - [36] JACKSON K L, YIN J, JI P. Sensitivity of *Phytophthora*

- and prospects for *Actinidia* viruses [J]. Plant Disease, 2022, 106(5): 1321–1329.
- [4] ZHAO Lei, YANG Wen, ZHANG Yuanle, et al. Occurrence and molecular variability of kiwifruit viruses in *Actinidia deliciosa* ‘Xuxiang’ in the Shaanxi province of China [J]. Plant Disease, 2019, 103(6): 1309–1318.
- [5] ZHAO Lei, CAO Mengji, HUANG Qianru, et al. Occurrence and distribution of *Actinidia* viruses in Shaanxi province of China [J]. Plant Disease, 2021, 105(4): 929–939.
- [6] WANG Yanxiang, WANG Guoping, BAI Jianyu, et al. A novel *Actinidia* cytorhabdovirus characterized using genomic and viral protein interaction features [J]. Molecular Plant Pathology, 2021, 22(10): 1271–1287.
- [7] PENG Qiding, QIU Long, YANG Ting, et al. A multiple reverse transcription PCR assay for simultaneous detection of four main viruses in kiwifruit [J]. European Journal of Plant Pathology, 2020, 156(4): 1207–1212.
- [8] VEERAKONE S, LIEFTING L W, TANG J, et al. The complete nucleotide sequence and genome organisation of a novel member of the family *Betaflexiviridae* from *Actinidia chinensis* [J]. Archives of Virology, 2018, 163(5): 1367–1370.
- [9] 温少华. 猕猴桃宏病毒组学分析及三种新发病毒的分子特性研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2020.
- [10] 朱丽娟,江朝杨,韩艳红. 茉莉 H 病毒外壳蛋白基因的克隆、原核表达及抗血清制备[J]. 植物病理学报, 2021, 51(4): 654–657.
- [11] 刘玉姿,张绍康,田畅,等. 甘蔗黄叶病毒运动蛋白的原核表达和抗血清制备[J]. 植物病理学报, 2020, 50(6): 694–701.
- [12] VERMA N, SHARMA A, RAM R, et al. Detection, identification and incidence of chrysanthemum B carlavirus in chrysanthemum in India [J]. Crop Protection, 2003, 22(2): 425–429.
- [13] 陶源,吴兴泉. 植物病毒检测方法的研究进展[J]. 分子植物育种, 2017, 15(7): 2901–2906.
- [14] 尤晴,李小宇,张春雨,等. 马铃薯 Y 病毒属三种病毒通用型单克隆抗体的鉴定[J]. 植物保护, 2016, 42(6): 76–79.
- [15] 刘湘宁,戴良英,董铮,等. 植物 RNA 病毒检测技术研究进展[J]. 现代农业科技, 2016(9): 150–152.
- [16] 徐小伟,陈雯,丁诗文,等. 甘蔗线条花叶病毒 P1 蛋白基因原核表达及抗血清制备[J]. 植物保护, 2022, 48(2): 157–161.

(责任编辑:田 喆)

capsici on vegetable crops in Georgia to mandipropamid, dimethomorph, and cyazofamid [J]. Plant Disease, 2012, 96(9): 1337–1342.

- [37] FRAC. General use recommendations [EB/OL]. (2020–05) [2022–03–21]. <http://www.frac.info/expert-fora/pheyl-amides/general-use-recommendations>.

(责任编辑:杨明丽)