

# 用等位基因特异性寡核苷酸 (ASO)-PCR 快速检测 抗多菌灵的油菜菌核病菌

李红霞, 周明国

(南京农业大学植物保护学院, 南京 210095)

**摘要:** 通过 3 对兼并性引物扩增获得与 *S. sclerotiorum* 抗药性相关的  $\beta$ -微管蛋白基因, 全长 1 685 bp, 包含 4 个内元, 相应的编码 447 个氨基酸。该基因与其它 6 种线状真菌的  $\beta$ -微管蛋白基因相比, 氨基酸序列同源性达 95.78%~97.66%, 但内元数目和大小不同。比较 *S. sclerotiorum* 敏感型和抗药性菌株的  $\beta$ -微管蛋白基因, 发现该基因第 198 位氨基酸由谷氨酸突变为丙氨酸, 从而导致田间抗药性的产生。为了快速、准确监测田间抗药性频率, 根据 *S. sclerotiorum*  $\beta$ -微管蛋白基因的突变位点设计了 2 对等位基因特异性寡核苷酸 (ASO), 直接以菌核的基因组 DNA 为模板扩增, 所需时间约为 6 h, 抗药性检出率为 100%, 与传统菌丝直径法的测定结果相比检测准确率为 96%, 而传统的检测方法至少需要 1~2 周。

**关键词:** 油菜菌核病菌;  $\beta$ -微管蛋白; 多菌灵抗药性; 等位基因特异性寡核苷酸 (ASO)-PCR

## Rapid Identification of Carbendazim Resistant Strains of *Sclerotinia sclerotiorum* Using Allele-Specific Oligonucleotide (ASO)-PCR

LI Hong-xia, ZHOU Ming-guo

(College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

**Abstract:** Benzimidazole fungicides are important mixture components to control rape sclerotinia rot disease in China. Carbendazim-resistant isolates of *Sclerotinia sclerotiorum* have been detected in fields since 1996. In this paper, three pairs of degenerate primers were used to amplify the  $\beta$ -tubulin gene from *S.sclerotiorum*. The gene from *S.sclerotiorum* has 1 685 bp, including 4 introns, encoding 447 amino acid. Except for the difference in the number of the introns, the deduced amino acid sequence of the  $\beta$ -tubulin gene from *S.sclerotiorum* are 95.78% to 97.66% identical to those of other six plant pathogenic filamentous fungi. Resistance was related to a point mutation in codon 198 where the glutamic acid has changed into alanine, which caused the occurrence of resistance field. A DNA fragment surrounding codon 198 was amplified directly from genomic DNA of sclerotinia using two pairs of Allele-Specific Oligonucleotide(ASO) primers to detect resistant frequency accurately. Using this method within 6 h, the detection rate for benzimidazole resistance was up to 100%; in comparison with the conventional assay procedure, which needs 1-2 weeks, the accuracy of the new method was 96%.

**Key words:** *Sclerotinia sclerotiorum*;  $\beta$ -tubulin; Carbendazim-resistance; Allele-Specific Oligonucleotide (ASO)-PCR

油菜菌核病是由核盘菌 [*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary] 引起的一种世界性病害, 严重影响油菜的产量和品质。长期以来采用高效、广谱、内吸性强的苯并咪唑类杀菌剂或以这类药剂为主的复配剂进行化学防治。1996 年潘以楼等已在江苏

省检测到油菜菌核病菌田间抗药性菌株<sup>[1]</sup>。近年来大量研究证明,  $\beta$ -微管蛋白基因的 198 或 200 位氨基酸密码子的点突变是导致大多难发现抗药性的存在, 而且传统的检测方法需要分离培养病原菌, 再培养进行药剂敏感性测定, 通常需要几周时间, 不仅工作量大<sup>[4]</sup>,

收稿日期: 2003-01-23

基金项目: 国家“863”计划资助项目 (2001AA249041)

作者简介: 李红霞 (1975-), 女, 新疆阿勒泰人, 博士, 主要从事病原真菌抗药性分子机制及检测技术研究。Tel (Fax): 025-84395641; E-mail: hxli2002@yahoo.com.cn



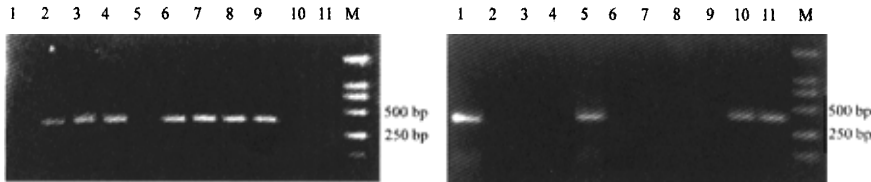
表 油菜菌核病菌的 $\beta$ -微管蛋白基因与其他常见植物病原真菌同源性比较(%)Table Comparison  $\beta$ -tubulin gene of *Sclerotinia sclerotiorum* with that of other common plant pathogenic fungi

植物病原真菌 Plant pathogenic fungi	序列号 Accession number of nucleotide and amino acid sequence	氨基酸水平同源性 Homology at amino acid level	内元数及大小 The number and size of introns
油菜菌核病菌 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	AY312374	/	4(182、8、48、53 bp)
马铃薯干腐病 <i>Gibberella pulicris</i> (tub2)	AF414866, AAN03787	95.78	3(197、57、48 bp)
水稻恶苗病菌 <i>Gibberella fujikuroi</i>	U27303, AAB18275	95.78	4(179、59、48、49 bp)
柑橘炭疽病菌	U14138, AAA62875	96.96	6(184、58、71、56、71、53 bp)
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> f.sp. <i>aeschynomene</i>			
灰霉病菌 <i>Botryotinia fuckeliana</i>	Z69263, CAA93254	97.66	6(135、53、69、56、52、56 bp)
粗糙链孢霉 <i>Neurospora crassa</i>	M13630, AAA33617	95.78	6(240、74、68、65、73、57 bp)
大麦云纹斑病菌 <i>Rhynchosporium secalis</i>	X81046, CAA56936	96.02	6(132、55、77、70、52、50 bp)

## 2.2 快速检测结果

直接从菌核中提取的基因组 DNA 含量与从菌丝中提取一样很高,紫外分光光度计检测 DNA 含量为  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。PCR 产物经电泳检测,结果表明 100 个样品中

48 个样品为抗药性菌株,52 个为敏感菌株,检出率达 100%,与传统的菌落直径法相比准确率达 96%。从提取菌核基因组 DNA 到 ASO-PCR 整个检测过程只需要 6 h。图 2 显示其中 11 个样品的 PCR 产物检测结果。



左、右两图相对应 1~11 的模板相同,左图用引物 S-TS/SS-1;右图用引物 S-TR/SS-1。Identical template correspondent to 1-11 on the left and right pictures, with primer pairs S-TS/SS-1 on the left one and S-TR/SS-1 on the right one

图 2 油菜菌核病菌 ASO-PCR 产物电泳图谱

Fig. 2 Electrophoresis of ASO-PCR products of *S. sclerotiorum*

## 3 讨论

油菜菌核病菌 $\beta$ -微管蛋白基因与其它病原真菌具高度同源性, $\beta$ -微管蛋白基因 198 位氨基酸的突变(Glu $\rightarrow$ Ala)导致田间抗药性的产生。尽管已知 $\beta$ -微管蛋白基因其余 9 个位点也能导致抗药性的产生,但 198 或 200 位氨基酸的突变常常是植物病原真菌田间抗药性产生的直接原因<sup>[4,6]</sup>。比较油菜菌核病菌和其它病原真菌的 $\beta$ -微管蛋白基因显示,其内元有 4 个,而其它真菌多有 6 个内元;所有内元均有 5' GTNA/TGT,略不同于其它真菌的 5' GTA/TNGT<sup>[7]</sup>。

目前国内主要采用菌落直径法检测油菜菌核病菌抗药性,但该方法涉及采样、分离和室内大量抑菌试验,周期长;常规的基因组 DNA 提取方法需要培养收集大量菌丝,冻干研磨后使用,较费时,同时该病原菌菌丝产生多糖较多,在 DNA 提取过程中难以全部去

除<sup>[8]</sup>,而直接从菌核中提取时多糖较少,提取效果好;从基因组的提取到 ASO-PCR 整个检测过程只需 6 h 即可,而传统的检测需要 1~2 周的时间<sup>[8]</sup>;检出率达 100%,与传统的菌落直径法相比准确率达 96%。因此,ASO-PCR 技术使快速、简便地检测和监测田间抗药性菌株成为可能,且方法简便,便于基层工作人员掌握。这对及时了解抗药性病原群体的发展动态,及时、合理地指导科学用药,有效治理抗药性,以及降低成本和减少环境污染具有现实意义。随着杀菌剂抗药性分子机制研究的深入,利用分子生物学技术的检测方法快速、简便、有效地检测杀菌剂抗性成为研究热点<sup>[6]</sup>。

## References

- [1] 潘以楼,汪智渊,吴汉章. 油菜菌核病菌对多菌灵的抗药性. 中国油料, 1997, 19(3):67-68.

- Pan, Y L, Wang Z Y, Wu Z H. Resistance to carbendazim in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Chinese Journal of Oil Crop Science*, 1997, 19(3): 67-68. (in Chinese)
- [2] McKay G J, Cooke L R. A PCR-based method to characterize and identify benzimidazole resistance in *Helminthosporium solani*. *FEMS Microbiology Letters*, 1997, 152:371-378.
- [3] Martin L A, Fox R T V, Baldwin B C. Use of polymerase chain reaction for the diagnosis of MBC resistance in *Botrytis cinerea*. 1992 *Brighton Crop Protection Conference-Pests and Diseases*. Surry:BCPC publications. 1992:207-214.
- [4] Ishii H. DNA-based approaches for diagnosis of fungicide resistance. Clark J M & Yamaguchi I. *Agrochemical Resistance Extent, Mechanism and Detection*. Washington DC: American Chemical Society, 2002:242-259.
- [5] Koenrardt H, Jones A L. The use of allele-specific oligonucleotide probes to characterize resistance to benomyl in field strains of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology*, 1992, 82:1 354 -1 359.
- [6] Sierotzki H, Gisi U. Molecular diagnostics for fungicide resistance in plant pathogens. Voss G & Ramos G. *Chemistry of Crop Protection*. Germany, 2003:71-88.
- [7] Wheeler I E, Kendall S I, Buttera J. Using allele-specific digonucleotide probes to characterize benzimidazole resistance in *Rhynchosporium secalis*. *Pesticide Science*, 1995, 43:201-209.
- [8] 李红霞, 周明国, 陆悦健. 应用 PCR 方法检测油菜菌核病菌对多菌灵的抗药性. 菌物系统, 2002, 21(3):370-374.
- Li H X, Zhou M G, Lu Y J. Using polymerase chain reaction for detection of carbendazim resistance in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycosystema*, 2002, 21(3):370-374. (in Chinese)
- [9] Moller E M, Bahney G, Sandermann H. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research*, 1992, 20(22):6 115-6 116.
- [10] 李红霞, 陆悦健, 王建新, 周明国. 禾谷镰孢菌  $\beta$ -微管蛋白基因克隆及其与多菌灵抗药性关系的分析. 微生物学报, 2003, 43(4):424-429.
- Li H X, Lu Y J, Wang J X, Zhou M G. Cloning of  $\beta$ -tubulin gene from *Gibberella zeae* and analysis its relationship with carbendazim-resistance. *Acta Microbiologica Sinica*, 2003, 43(4):424-429. (in Chinese)
- [11] 李红霞, 陆悦健, 周明国, 王晓峰. 油菜菌核病菌  $\beta$ -微管蛋白基因与多菌灵抗药性相关突变的研究. 中国油料作物学报, 2003, 25(2):56-60.
- Li H X, Lu Y J, Zhou M G, Wang X F. Mutation in  $\beta$ -tubulin of *Sclerotinia sclerotiorum* conferring resistance to carbendazim in rapeseed field isolates. *Chinese Journal of Oil Crop Science*, 2003, 25(2):56-60. (in Chinese)

(责任编辑 王红艳)