

# 2017年辽宁省番茄灰霉病菌对腐霉利的抗药性现状及机制研究

杜颖 付丹妮 邹益泽 白雪松 姜震 程功 纪明山\* 祁之秋\*

(沈阳农业大学植物保护学院, 辽宁沈阳 110866)

**摘要:** 从辽宁省8个地区的番茄种植区中采集、分离纯化得到番茄灰霉病 (*Botrytis cinerea*) 单孢菌株115株, 采用菌丝生长速率法测定其对腐霉利的抗药性, 并对抗药性分子机制进行研究。结果表明, 辽宁省番茄灰霉病菌对腐霉利的抗药性呈现加重的趋势, 8个地区番茄灰霉病菌对腐霉利的敏感性差异较大,  $EC_{50}$  值分布在  $0.05 \sim 16.30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  之间, 平均为  $3.99 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 抗性频率达到 83.48%, 以中抗菌株为主, 但在阜新和盘锦地区检测到高抗菌株。对抗性菌株 *BcOS1* 基因序列分析表明, 所选抗性菌株在第 369 位和第 373 位的氨基酸同时发生突变。

**关键词:** 番茄; 灰霉病菌; 腐霉利; 抗药性; 分子机制

在农业生产中, 由灰葡萄孢 (*Botrytis cinerea*) 引起的灰霉病是一种需要重点防治的真菌性病害, 可侵染多种蔬菜和水果, 对作物的产量和品质造成严重破坏 (Jiang et al., 2009; 张彩凤等, 2013; 张玮等, 2013)。由于灰霉病菌的生命周期非常短, 孢子产生量大, 对防治药剂极易产生抗药性 (Rosslensbroich & Stuebler, 2000), 如灰霉病菌对苯并咪唑类、二甲酰亚胺类及氨基甲酸酯类等杀菌剂的抗性已多见报道, 抗性日趋严重 (丁中等, 2001; 赵建江等, 2010; Zhang et al., 2011)。腐霉利属于二甲酰亚胺类杀菌剂, 于 20 世纪 80 年代在我国投入使用, 虽应用时间较长, 但因其防效高、对作物安全等特点, 目前依旧作为防治番茄灰霉病的主要药剂 (徐作珽等, 2001; 石延霞等, 2016)。其抗性问题在辽宁省也较为突出, 农民在使用时往往会加大药量来提高药效, 而由此造成的

农药滥用问题十分普遍, 还会引起农药残留的潜在危害 (赵晓军等, 2010; 宋晰等, 2013)。

在实际田间生产中, 农药抗性问题复杂多变, 需要及时对其进行监测, 更新数据, 了解抗性现状, 以便做出准确全面的评估 (Leroux et al., 2002; Ma & Michailides, 2005)。鉴于此, 本试验采集了辽宁省8个地区的番茄灰霉病菌的田间种群, 系统测定了115株番茄灰霉病单孢菌株对腐霉利的抗药性, 明确了当前辽宁省各地区番茄灰霉病对腐霉利的抗药性现状, 并探究了抗药性的分子机制, 以期对番茄灰霉病抗药性治理及田间有效防治提供借鉴, 并能指导农民正确施药, 减少抗性药剂的滥用, 推动农药减施。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试药剂为 95% 腐霉利 (procymidone) 原药, 由沈阳化工研究院有限公司测试与评价中心提供。

供试菌株为番茄灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*): 2017年从辽宁省沈阳、普兰店、盘锦、葫芦岛、朝阳、丹东、法库、阜新等8个番茄栽培区采集番茄灰霉病病叶和病果, 并于实验室内进行分离、纯化和培养, 单孢菌株低温保存于沈阳农业大学农药学实验室, 共计获得115株番茄灰霉病单孢菌株。

杜颖, 女, 硕士研究生, 专业方向: 农药毒理学, E-mail: duyings2m@163.com

\* 通讯作者 (Corresponding authors): 纪明山, 男, 教授, 专业方向: 农药学, E-mail: jimingshan@163.com; 祁之秋, 女, 副教授, 专业方向: 农药毒理学, E-mail: syqizhiqiu@sina.com

收稿日期: 2017-09-13; 接受日期: 2017-11-23

基金项目: 公益性行业 (农业) 科研专项 (201303025), 国家自然科学基金项目 (31101466)

供试培养基: 马铃薯琼脂培养基 (PDA): 称取葡萄糖 20 g、去皮马铃薯 200 g, 琼脂条 20 g, 加蒸馏水定容至 1 000 mL, 煮沸, 经纱布过滤后所得液体于 121 °C 下经高压蒸汽灭菌 30 min, 而后用于番茄灰霉病菌的培养保存以及对腐霉利敏感性的测定。马铃薯葡萄糖液体培养基 (PD): 称取葡萄糖 20 g、去皮马铃薯 200 g, 加蒸馏水定容至 1 000 mL, 煮沸, 经纱布过滤后所得液体于 121 °C 下经高压蒸汽灭菌 30 min, 而后用于番茄灰霉病菌的培养。

## 1.2 试验方法

1.2.1 含药培养基的配制 将腐霉利原药用丙酮溶解, 配制成  $10\ 000\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的母液, 而后逐级稀释, 按一定比例加到灭菌后的培养基中, 制成所需浓度的含药培养基。

1.2.2 番茄灰霉病菌对腐霉利的敏感性测定 采用菌丝生长速率法测定 115 株番茄灰霉病菌对腐霉利的敏感性: 设置 6 个浓度梯度, 以不添加腐霉利原药为空白对照, 将培养后的各菌株取直径 5 mm 菌饼接种于含药培养基平板中央, 每处理 3 次重复, 在 25 °C 下黑暗培养 72 h。测量菌落直径, 计算菌丝生长抑制率, 并利用 SPSS 软件计算有效抑制中浓度 ( $\text{EC}_{50}$  值)、95% 置信限、毒力回归方程及相关系数 ( $R$ )。

1.2.3 番茄灰霉病菌对腐霉利抗性指数的测定及其抗性水平的划分 依据宋晰等 (2013) 测定的番茄灰霉病菌对腐霉利的敏感基线值 ( $0.31\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 对 115 株番茄灰霉病菌进行抗性指数的测定和抗药性水平的判别。抗性水平判别依据: 当抗性指数 ( $\text{RF}$ )  $\leq 5$ , 即菌株的  $\text{EC}_{50} \leq 1.55\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  为敏感菌株; 当  $5 < \text{RF} \leq 10$ , 即  $1.55\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1} < \text{EC}_{50} \leq 3.10\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  为低抗菌株; 当  $10 < \text{RF} \leq 40$ , 即  $3.10\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1} < \text{EC}_{50} \leq 12.40\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  为中抗菌株; 当  $\text{RF} > 40$ , 即  $\text{EC}_{50} > 12.40\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  为高抗菌株。计算统计各地区番茄灰霉病菌的抗性频率。

1.2.4 番茄灰霉病菌的 DNA 提取及 PCR 反应体系 选取低抗菌株 LNFK-1、LNHLD-16, 中抗菌株 LNSY-1、LNCY-8、LNDD-11、LNPLD-16 以及高抗菌株 LNPJ-11、LNFY-6 作为研究对象。接种菌饼于马铃薯葡萄糖液体培养基中, 22 °C、120  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  振荡培养 4 d 后去除菌饼, 用去离子水冲洗、过滤

菌丝, 重复冲洗 3 次, 真空抽滤 15 min, 35 °C 下烘干 1 d。将菌丝研磨成粉末。取 10 mg 菌丝粉采用 Omega 真菌基因组 DNA 抽提试剂盒 (D3390-01, Omega Bio-tek, 美国) 进行 DNA 的提取, 并用紫外分光光度计法检测 DNA 的浓度和纯度。而后根据 NCBI 的 GenBank 登记的番茄灰霉病菌 (*BcOS1*) 基因序列 (AF396827.2), 利用 Primer premier 5 和 Oligo 6.0 程序设计 4 对引物 (表 1), 包含了已经在其他植物中报道的 2 个 *BcOS1* 基因位点。并用梯度 PCR 仪确定每对引物的最佳退火温度。引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

表 1 扩增番茄灰霉病菌的引物序列

引物名称	序列 (5'-3')	退火温度/°C	目的片段大小/bp
F1	GCTCTCGAAAGGGAAGCTG	62	1 719
R1	TTCGGCAGCGTCCCTAGC		
F2	GCGGGTCAAATACTCATACT	55	972
R2	CTCTGTGAACCTTGATAGCGT		
F3	GGTAGACGGAAAATTATTC	60	707
R3	TTGTACCTTCTTACTGAGATC		
F4	AGGCAACTGAGAAGTTCC	60	1 630
R4	ATATCATCGAACTTCGGC		

PCR 反应体系 (25  $\mu\text{L}$ ): 10 $\times$  PCR Buffer 2.5  $\mu\text{L}$ , dNTPs (25 mmol  $\cdot\text{L}^{-1}$ ) 2.5  $\mu\text{L}$ , hk1F (20 ng  $\cdot\text{L}^{-1}$ ) 2.0  $\mu\text{L}$ , hk1R (20 ng  $\cdot\text{L}^{-1}$ ) 2.0  $\mu\text{L}$ , *Taq* DNA Polymerase (2 U  $\cdot\text{L}^{-1}$ ) 1.0  $\mu\text{L}$ , DNA Template 1.0  $\mu\text{L}$  以及 ddH<sub>2</sub>O 14.0  $\mu\text{L}$ 。扩增反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min, 在每个引物的最佳退火温度下退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 共 34 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。反应结束后取 8  $\mu\text{L}$  PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析扩增效果。若扩增产物电泳条带清晰, 则扩大 PCR 反应体系至 50  $\mu\text{L}$ 。扩增产物电泳后, 切下目的基因片断胶, 称量回收胶, 用胶回收试剂盒 [Takara Agarose Gel DNA Purification Kit, Ver.2.0, 宝生物工程 (大连) 有限公司] 回收。

1.2.5 测序及序列分析 序列测定采用美国 ABI 公司的 3730XL 测序仪和双脱氧链终止法进行, 由生工生物工程 (上海) 股份有限公司完成测序。对 8 个目标菌株进行突变检测。将序列进行 BLAST 比对, 然后用 DNAMAN 8.0 软件对抗药性和敏感性番茄灰霉病 *BcOS1* 基因片段序列进行比对。

## 2 结果与分析

### 2.1 辽宁省番茄灰霉病菌对腐霉利的敏感性及其抗性指数测定

从表 2 可以看出, 辽宁省 8 个地区番茄灰霉

病菌对腐霉利的  $EC_{50}$  值平均为  $3.99 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在所测菌株中, 最高  $EC_{50}$  值为  $16.30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 抗性指数为 52.58, 已达高抗水平, 是最低  $EC_{50}$  值  $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 326 倍。抗性指数分布在 0.16 ~ 52.58 之间, 平均抗性指数为 12.87。

表 2 辽宁省番茄灰霉病菌对腐霉利的敏感性

菌株编号	$EC_{50}/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	95% 置信区间/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	毒力方程	相关系数 R	抗性指数 RF
LNPJ-1	4.73	3.36 ~ 6.67	$y=1.0574x+4.2862$	0.9227	15.26
LNPJ-2	3.48	2.37 ~ 5.12	$y=0.8587x+4.5348$	0.9353	11.23
LNPJ-3	2.49	1.72 ~ 3.59	$y=0.8991x+4.6445$	0.9876	8.03
LNPJ-4	0.61	0.28 ~ 1.35	$y=0.5671x+5.1211$	0.9717	1.97
LNPJ-5	6.83	4.83 ~ 9.67	$y=0.9033x+4.2462$	0.9958	22.03
LNPJ-6	7.72	5.81 ~ 10.25	$y=1.2002x+3.9348$	0.9791	24.90
LNPJ-7	9.80	5.63 ~ 17.07	$y=0.5420x+4.4626$	0.9888	31.61
LNPJ-8	8.53	5.16 ~ 14.12	$y=0.5940x+4.4469$	0.9939	27.52
LNPJ-9	3.32	2.26 ~ 4.88	$y=0.8593x+4.5519$	0.9674	10.71
LNPJ-10	4.16	2.82 ~ 6.15	$y=0.8049x+4.5013$	0.9887	13.42
LNPJ-11	12.79	9.22 ~ 17.74	$y=1.0420x+3.8466$	0.9544	41.26
LNPJ-12	8.61	6.01 ~ 12.33	$y=0.8726x+4.1842$	0.9961	27.77
LNPJ-13	8.00	6.05 ~ 10.58	$y=1.3629x+3.7690$	0.9392	25.81
LNPJ-14	5.40	3.66 ~ 7.97	$y=0.9200x+4.3259$	0.9177	17.42
LNHLD-1	7.91	5.89 ~ 10.62	$y=1.1330x+3.9825$	0.9838	25.52
LNHLD-2	8.12	6.22 ~ 10.61	$y=1.3117x+3.8066$	0.9820	26.19
LNHLD-3	6.48	4.69 ~ 8.95	$y=1.0445x+4.1521$	0.9613	20.90
LNHLD-4	4.07	2.92 ~ 5.68	$y=1.0043x+4.3874$	0.9744	13.13
LNHLD-5	7.22	5.01 ~ 10.40	$y=0.8801x+4.2444$	0.9450	23.29
LNHLD-6	3.97	2.76 ~ 5.71	$y=0.8677x+4.4805$	0.9958	12.81
LNHLD-7	7.17	5.50 ~ 9.34	$y=1.4000x+3.8027$	0.9735	23.13
LNHLD-8	5.15	3.79 ~ 7.01	$y=1.2259x+4.2271$	0.9418	16.61
LNHLD-9	8.60	6.71 ~ 11.00	$y=1.4936x+3.6046$	0.9879	27.74
LNHLD-10	10.08	7.89 ~ 12.87	$y=1.5098x+3.4849$	0.9895	32.52
LNHLD-11	5.67	4.19 ~ 7.67	$y=1.1392x+4.1417$	0.9667	18.29
LNHLD-12	3.50	2.59 ~ 4.72	$y=1.1705x+4.3637$	0.9817	11.29
LNHLD-13	6.10	4.01 ~ 9.27	$y=0.7220x+4.4332$	0.9880	19.68
LNHLD-14	3.82	2.58 ~ 5.65	$y=0.9429x+4.4512$	0.8956	12.32
LNHLD-15	1.64	1.15 ~ 2.34	$y=1.0597x+4.7718$	0.9665	5.29
LNHLD-16	3.01	2.25 ~ 4.03	$y=1.1808x+3.4352$	0.9815	9.71
LNHLD-17	0.05	0.00 ~ 0.78	$y=0.6592x+5.8546$	0.9132	0.16
LNCY-1	3.78	2.55 ~ 5.62	$y=0.8539x+4.5067$	0.9988	12.19
LNCY-2	4.05	2.89 ~ 5.67	$y=1.0528x+4.3606$	0.9586	13.06
LNCY-3	2.07	1.24 ~ 3.45	$y=0.7475x+4.7642$	0.9757	6.68
LNCY-4	1.53	1.04 ~ 2.25	$y=1.1575x+4.7858$	0.9443	4.94
LNCY-5	4.13	3.10 ~ 5.50	$y=1.2595x+4.2249$	0.9847	13.32
LNCY-6	4.05	2.90 ~ 5.64	$y=1.0696x+4.3508$	0.9540	13.06
LNCY-7	4.03	2.77 ~ 5.87	$y=0.8952x+4.4577$	0.9992	13.00
LNCY-8	3.24	2.31 ~ 4.55	$y=1.0467x+4.4650$	0.9959	10.45
LNCY-9	2.05	1.33 ~ 3.18	$y=0.8923x+4.7211$	0.9943	6.61
LNCY-10	4.97	3.44 ~ 7.17	$y=0.8995x+4.3738$	0.9905	16.03
LNDD-1	2.06	1.24 ~ 3.43	$y=0.7532x+4.7637$	0.9974	6.65
LNDD-2	2.29	1.51 ~ 3.49	$y=0.8963x+4.6772$	0.9899	7.39
LNDD-3	2.69	1.78 ~ 4.05	$y=0.8845x+4.6203$	0.9994	8.68

续表

菌株编号	EC <sub>50</sub> /mg · L <sup>-1</sup>	95% 置信区间/mg · L <sup>-1</sup>	毒力方程	相关系数 R	抗性指数 RF
LNDD-4	1.94	1.15 ~ 3.27	y=0.757 0 x+4.782 0	0.983 1	6.26
LNDD-5	1.40	0.76 ~ 2.58	y=0.701 9 x+4.897 6	0.997 2	4.52
LNDD-6	1.79	0.96 ~ 3.36	y=0.636 0 x+4.839 1	0.993 1	5.77
LNDD-7	0.96	0.33 ~ 2.76	y=0.460 8 x+5.008 5	0.972 0	3.10
LNDD-8	1.35	0.73 ~ 2.50	y=0.704 2 x+4.908 4	0.991 5	4.35
LNDD-9	3.48	2.25 ~ 5.38	y=0.781 2 x+4.577 0	0.991 7	11.23
LNDD-10	3.06	2.13 ~ 4.37	y=1.009 9 x+4.510 2	0.981 4	9.87
LNDD-11	4.07	2.83 ~ 5.87	y=0.941 9 x+4.425 5	0.971 9	13.13
LNDD-12	3.57	2.48 ~ 5.14	y=0.938 7 x+4.481 0	0.979 9	11.52
LNDD-13	3.56	2.50 ~ 5.08	y=0.979 3 x+4.459 6	0.986 3	11.48
LNFK-1	1.99	1.49 ~ 2.66	y=1.442 7 x+4.568 9	0.972 4	6.42
LNFK-2	0.69	0.38 ~ 1.24	y=0.958 2 x+5.157 2	0.999 3	2.23
LNFK-3	2.72	2.14 ~ 3.45	y=1.800 6 x+4.217 5	0.972 2	8.77
LNFK-4	1.40	0.89 ~ 2.23	y=0.944 0 x+4.860 7	0.993 1	4.52
LNFK-5	0.06	0.01 ~ 0.35	y=0.797 5 x+5.974 1	0.968 1	0.19
LNFK-6	2.76	2.22 ~ 3.44	y=1.914 5 x+4.154 9	0.982 1	8.90
LNFK-7	2.61	1.82 ~ 3.73	y=1.080 9 x+4.550 4	0.957 5	8.42
LNFK-8	4.33	3.17 ~ 5.90	y=1.143 5 x+4.272 6	0.975 2	13.97
LNFK-9	0.81	0.43 ~ 1.54	y=0.815 7 x+5.074 7	0.999 6	2.61
LNFK-10	2.40	1.60 ~ 3.61	y=0.928 8 x+4.646 2	0.984 0	7.74
LNFK-11	2.45	1.64 ~ 3.64	y=0.969 0 x+4.623 3	0.956 1	7.90
LNFK-12	0.13	0.03 ~ 0.49	y=0.892 4 x+5.790 9	0.994 1	0.42
LNFK-13	2.20	1.61 ~ 3.01	y=1.242 8 x+4.573 3	0.995 5	7.10
LNFK-14	0.29	0.09 ~ 0.98	y=0.607 1 x+5.325 2	0.991 8	0.94
LNFK-15	0.07	0.01 ~ 0.43	y=1.007 7 x+6.152 4	0.947 2	0.23
LNFX-1	3.90	2.59 ~ 5.86	y=0.820 2 x+4.515 6	0.999 3	12.58
LNFX-2	1.85	1.21 ~ 2.83	y=0.960 8 x+4.743 4	0.977 5	5.97
LNFX-3	0.47	0.19 ~ 1.19	y=0.677 7 x+5.220 6	0.999 7	1.52
LNFX-4	0.81	0.39 ~ 1.71	y=0.700 6 x+5.062 9	0.996 1	2.61
LNFX-5	5.80	4.24 ~ 7.93	y=1.072 4 x+4.181 6	0.998 5	18.71
LNFX-6	16.30	9.79 ~ 29.13	y=0.738 7 x+4.104 5	0.984 0	52.58
LNFX-7	5.09	3.50 ~ 7.40	y=0.876 3 x+4.380 7	0.996 1	16.42
LNFX-8	9.11	5.97 ~ 13.92	y=0.778 3 x+4.253 1	0.999 3	29.39
LNFX-9	1.93	1.19 ~ 3.15	y=0.799 8 x+4.771 0	0.992 7	6.23
LNFX-10	4.56	3.29 ~ 6.32	y=1.070 1 x+4.295 1	0.965 9	14.71
LNFX-11	1.01	0.53 ~ 1.91	y=0.757 7 x+4.997 2	0.999 0	3.26
LNFX-12	0.86	0.47 ~ 1.59	y=0.838 7 x+5.053 1	0.995 6	2.77
LNPLD-1	3.18	1.99 ~ 5.09	y=0.758 0 x+4.618 8	0.922 7	10.26
LNPLD-2	4.97	3.09 ~ 7.99	y=0.680 0 x+4.526 3	0.988 0	16.03
LNPLD-3	4.59	3.22 ~ 6.52	y=0.969 0 x+4.359 0	0.967 8	14.81
LNPLD-4	3.54	2.02 ~ 6.21	y=0.593 6 x+4.674 3	0.998 0	11.42
LNPLD-5	5.70	3.88 ~ 8.37	y=0.886 3 x+4.329 9	0.906 3	18.39
LNPLD-6	2.04	1.15 ~ 3.62	y=0.673 5 x+4.791 2	0.987 6	6.58
LNPLD-7	3.69	2.60 ~ 5.23	y=0.999 6 x+4.433 3	0.990 5	11.90
LNPLD-8	7.34	3.86 ~ 13.96	y=0.488 9 x+4.576 8	0.987 4	23.68
LNPLD-9	3.38	2.42 ~ 4.72	y=1.065 0 x+4.436 3	0.988 2	10.90
LNPLD-10	1.31	0.38 ~ 4.54	y=0.352 1 x+4.958 8	0.972 0	4.23
LNPLD-11	2.29	1.47 ~ 3.55	y=0.852 5 x+4.693 6	0.976 5	7.39
LNPLD-12	0.91	0.56 ~ 1.50	y=1.022 4 x+5.040 1	0.998 9	2.94
LNPLD-13	7.99	5.45 ~ 11.72	y=0.864 8 x+4.219 3	0.938 8	25.77

续表

菌株编号	EC <sub>50</sub> /mg · L <sup>-1</sup>	95% 置信区间/mg · L <sup>-1</sup>	毒力方程	相关系数 R	抗性指数 RF
LNPLD-14	7.03	5.04 ~ 9.81	y=0.999 3 x+4.153 6	0.997 3	22.68
LNPLD-15	2.50	0.94 ~ 6.67	y=0.365 1 x+4.854 6	0.999 7	8.06
LNPLD-16	7.08	4.30 ~ 11.64	y=0.639 0 x+4.456 9	0.990 3	22.84
LNPLD-17	2.68	1.65 ~ 4.34	y=0.734 1 x+4.686 1	0.950 3	8.65
LNPLD-18	4.52	2.94 ~ 6.94	y=0.770 5 x+4.495 3	0.970 6	14.58
LNPLD-19	4.35	3.00 ~ 6.32	y=0.894 5 x+4.428 7	0.981 2	14.03
LNSY-1	5.02	3.64 ~ 6.91	y=1.089 3 x+4.237 1	0.998 9	16.19
LNSY-2	4.21	2.81 ~ 6.32	y=0.842 6 x+4.473 7	0.997 8	13.58
LNSY-3	4.95	3.76 ~ 6.53	y=1.312 9 x+4.087 7	0.998 3	15.97
LNSY-4	7.90	5.36 ~ 11.66	y=0.869 1 x+4.219 8	0.996 8	25.48
LNSY-5	3.40	2.50 ~ 4.64	y=1.265 4 x+4.327 0	0.963 2	10.97
LNSY-6	4.22	2.83 ~ 6.30	y=0.868 4 x+4.456 5	0.969 0	13.61
LNSY-7	2.94	2.06 ~ 4.21	y=1.033 6 x+4.515 2	0.998 2	9.48
LNSY-8	3.08	2.12 ~ 4.47	y=0.971 0 x+4.525 4	0.980 6	9.94
LNSY-9	2.23	1.20 ~ 4.14	y=0.621 8 x+4.783 5	0.993 1	7.19
LNSY-10	2.83	1.82 ~ 4.41	y=0.820 1 x+4.629 5	0.982 1	9.13
LNSY-11	2.13	0.97 ~ 4.66	y=0.497 6 x+4.837 1	0.973 4	6.87
LNSY-12	3.02	1.96 ~ 4.63	y=0.837 3 x+4.598 6	0.979 2	9.74
LNSY-13	2.66	1.78 ~ 3.96	y=0.950 0 x+4.596 7	0.983 3	8.58
LNSY-14	3.11	1.97 ~ 4.90	y=0.778 9 x+4.616 6	0.979 3	10.03
LNSY-15	6.29	4.80 ~ 8.23	y=1.353 2 x+3.919 7	0.995 1	20.29

2.2 辽宁省番茄灰霉病菌对腐霉利的抗药性水平、频率及分布

从表 3 可以看出, 在 115 株番茄灰霉病菌菌株中, 敏感菌株 19 株, 抗性菌株 96 株, 抗性频率 83.48%。其中低抗菌株为 31 株, 中抗菌株为 63 株, 高抗菌株仅有 2 株。可见, 中抗菌株占比最大, 为 65.62%。

辽宁省不同地区番茄灰霉病菌对腐霉利的抗药性存在差异 (表 3), 其中 5 个地区的番茄灰霉病菌对腐霉利的抗药性频率超过了 80%。沈阳地区的抗性最为严重, 抗性频率高达 100.00%; 而法库地区的抗性频率最低, 仅为 53.33%, 在所检测

到的 8 株抗性菌株中, 有 7 株为低抗菌株, 仅有 1 株为中抗菌株。大部分地区的抗性菌株都以中抗菌株为主, 仅在盘锦和阜新所采集的番茄灰霉病菌菌株中各检测到 1 株高抗菌株。

2.3 番茄灰霉病菌对腐霉利的抗药性分子机制

用 4 对引物扩增番茄灰霉病菌不同种群基因组 DNA, 分别得到大约 1 719、972、707、1 630 bp 的 4 个片段 (图 1)。随后进一步测定了 8 个抗性菌株的基因序列, 在 NCBI 中与已经登记的番茄灰霉病菌灰葡萄孢组氨酸激酶基因 (*BcOSI*) 进行 BLAST 比对, 其序列同源性达到 98%, 证实这段序列正是 *BcOSI* 序列。根据已报道的 *BcOSI* 基因序列设计

表 3 辽宁省番茄灰霉病菌对腐霉利的抗性及其抗性频率

采集地	菌株数	EC <sub>50</sub> 范围/mg · L <sup>-1</sup>	EC <sub>50</sub> 平均值 / mg · L <sup>-1</sup>	抗性菌株表现/株				抗性菌株数/株	抗性频率/%
				敏感	低抗	中抗	高抗		
沈阳 (LNSY)	15	2.13 ~ 7.90	3.87	0	7	8	0	15	100.00
普兰店 (LNPLD)	19	0.91 ~ 7.99	4.16	2	4	13	0	17	89.47
盘锦 (LNPLD)	14	0.61 ~ 12.79	6.18	1	1	11	1	13	92.86
葫芦岛 (LNHLD)	17	0.05 ~ 10.08	5.44	1	2	14	0	16	94.12
朝阳 (LNCY)	10	1.53 ~ 4.97	3.39	1	2	7	0	9	90.00
丹东 (LNDD)	13	0.96 ~ 4.07	2.48	3	6	4	0	10	76.92
法库 (LNFK)	15	0.06 ~ 4.33	1.66	7	7	1	0	8	53.33
阜新 (LNFX)	12	0.47 ~ 16.30	4.31	4	2	5	1	8	66.67
总计	115	0.05 ~ 16.30	3.99	19	31	63	2	96	83.48

特异引物，经 PCR 扩增和测序，8 个腐霉利抗性菌株组氨酸激酶基因序列全长为 5 675 bp，编码 1 315 个氨基酸。其中保守区域有 2 180 bp，编码 619 个氨基酸；非保守区域有 3 495 bp，编码 696 个氨基酸。对灰葡萄孢野生敏感菌株和野生抗二甲酰亚胺类药剂菌株的双组分组氨酸激酶基因 (*BcOS1*) 进行比较发现 (图 2)，在测定的所有样本中，第 369 位氨基酸都由谷氨酰胺突变成脯氨酸，第 373 位氨基酸由天冬酰胺突变成丝氨酸，所选抗性菌株的 *BcOS1* 基因均发生了双位点突变。

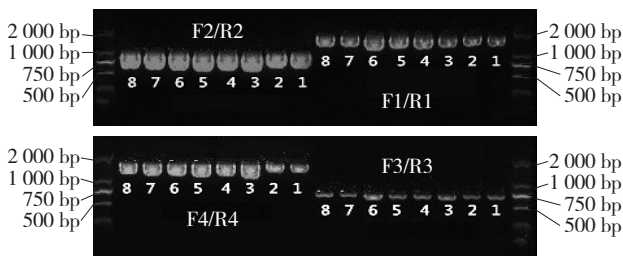


图 1 番茄灰霉病抗腐霉利菌株 *BcOS1* 基因扩增结果

M, DNA Marker; 1~8 依次为菌株 LNFK-1、LNHL-16、LNSY-1、LNCY-8、LNDD-11、LNPLD-16、LNPJ-11、LNFx-6。

AF 396827.2	92	147	367	368	369	370	371	372	373	374	375
	GAC	AGA	GGC	GTC	CAG	GGC	ATG	TGG	AAC	ACA	TTG
LNFK-1	D	R	A	A	Q	G	M	W	N	T	L
	GAT	AGG	GGC	GTC	CCG	GGC	ATG	TGG	AGC	ACA	TTG
LNHL-16	D	R	A	A	P	G	M	W	S	T	L
	GAT	AGG	GGC	GTC	CCG	GGC	ATG	TGG	AGC	ACA	TTG
LNSY-1	D	R	G	A	P	G	M	W	S	T	L
	GAT	AGG	GGC	GTC	CCG	GGC	ATG	TGG	AGC	ACA	TTG
LNCY-8	D	R	G	A	P	G	M	W	S	T	L
	GAT	AGG	GGC	GTC	CCG	GGC	ATG	TGG	AGC	ACA	TTG
LNDD-11	D	R	G	A	P	G	M	W	S	T	L
	GAT	AGG	GGC	GTC	CCG	GGC	ATG	TGG	AGC	ACA	TTG
LNPLD-16	D	R	G	A	P	G	M	W	S	T	L
	GAT	AGG	GGC	GTC	CCG	GGC	ATG	TGG	AGC	ACA	TTG
LNPJ-11	D	R	G	A	P	G	M	W	S	T	L
	GAT	AGG	GGC	GTC	CCG	GGC	ATG	TGG	AGC	ACA	TTG
LNFx-6	D	R	G	A	P	G	M	W	S	T	L
	GAT	AGG	GGC	GTC	CCG	GGC	ATG	TGG	AGC	ACA	TTG
	D	R	G	A	P	G	M	W	S	T	L

图 2 抗药种群番茄灰霉病菌 *BcOS1* 基因片断及其氨基酸残基的比对

### 3 结论与讨论

番茄灰霉病菌一直是番茄生产中需要重点防治的高风险病菌，病害的发生也往往会种植者造成重大的经济损失。特别是随着设施农业的发展，温室环境更有利于病菌的滋生，为病害的发生提供了有利条件，近几年番茄灰霉病也呈现出加重的趋势 (姚士桐等, 2011)。当前，番茄灰霉病的防治主要还是依靠化学防治，特别是当病害大面积暴发时，化学药剂依然是应对问题的首选 (赵杨等, 2014)。但由于灰霉病菌变异快、产孢量大、易传播等特点，对各类防治药剂较易产生抗药性，且目

前以腐霉利、啞霉胺为代表的防治番茄灰霉病的主要药剂使用年限都已较长，抗药性问题也较为普遍，在实际应用中就会存在种植者肆意加大用药量，滥用药剂的情况 (乔广行等, 2013)。所以在当前形势下，为应对国家农药减施的要求，明确番茄灰霉病菌的抗药性现状，对指导农民合理施药，制定病害的防治措施都有重要意义。

本试验测定了 2017 年采自辽宁省沈阳、普兰店、盘锦、葫芦岛、朝阳、丹东、法库、阜新等 8 个地区的 115 株灰霉病菌菌株对腐霉利的敏感性，依据宋晰等 (2013) 建立的番茄灰霉病菌对腐霉利的敏感基线，明确了辽宁省番茄灰霉病菌对腐霉利的抗药性现状，统计分析了其抗性频率及分布。结果表明，辽宁省番茄灰霉病菌对腐霉利的抗性频率高达 83.48%，抗药性已十分普遍。在前人的研究中，辽宁省灰霉病菌对腐霉利的抗性频率低，且多以低抗菌株为主 (张传清等, 2006; 刘妍, 2015)，本试验结果表明，辽宁省番茄灰霉病菌对腐霉利的抗药性呈现加重的趋势，抗性菌株由以前的低抗菌株为主发展到现在中抗菌株占据主体地位，且在部分地区发现了高抗菌株。而辽宁省不同地区番茄灰霉病菌对腐霉利的抗药性情况也存在差异，沈阳地区的番茄灰霉病菌对腐霉利的抗药性最为普遍，抗性频率达到了 100%，而盘锦地区番茄灰霉病菌对腐霉利的抗药性则最为严重，其平均 EC<sub>50</sub> 值为 6.18 mg · L<sup>-1</sup>，抗性指数平均值高达 19.92。

目前，与灰霉病菌对二甲酰亚胺类抗药性相关的 *BcOS1* 基因可在第 365、368、369、373 位 4 个氨基酸位点发生突变，已报道的突变类型有 7 种 (詹家绥等, 2014; 张鑫和马雪梅, 2014)，大多数的抗性菌株只在 1 个位点发生突变，双位点同时发生突变的较少 (Ma et al., 2007; Banno et al., 2008)。但在本试验中，对随机选取的 8 个抗性菌株进行分子检测及基因序列分析时发现，所有抗性菌株 *BcOS1* 基因的第 369 位和第 373 位氨基酸均同时发生突变，引起这一特征的原因尚不清楚，推测可能与地区环境和用药特点有关。如果这一推论得到证实，能否在病原菌外部环境与其内在基因突变之间建立某种直接的联系，以便直接根据地区的具体状况来推断该地区病菌发生何种突变，但这种猜想的具体验证还尚待大量研究 (Ma & Michailides,

2005)。

综上,在应对番茄灰霉病时,辽宁省应适当限制腐霉利的应用,以避免抗药性的进一步加重。而引进新型杀菌剂与生物农药,轮换使用嘧菌酯、嘧霉胺等不同类别的化学药剂进行灰霉病防治,也有助于控制番茄灰霉病菌抗药性的发展。从长远来看,则需要进一步加强番茄灰霉病菌抗药性的监测和治理,开发灰霉病防治的综合技术,摆脱该类病害防治对化学药剂的过度依赖,从根源上解决抗药性问题,响应国家农药减施的发展要求,推动农业的可持续发展。

#### 参考文献

- 丁中,刘峰,王会利,吴春先,慕立义. 2001. 番茄灰霉菌的多重抗药性研究. 山东农业大学学报:自然科学版, 32(4): 452-456.
- 刘妍. 2015. 辽宁省番茄灰霉病菌抗药性研究〔硕士论文〕. 沈阳:沈阳农业大学.
- 乔广行,林秀敏,黄金宝,周莹,李兴红. 2013. 8种杀菌剂对番茄灰霉病菌多重抗药性菌株生物活性测定. 农药, 52(1): 57-59.
- 石延霞,唐明,晋知文,谢学文,柴阿丽,李宝聚. 2016. 蔬菜作物灰葡萄孢菌对不同类杀菌剂的抗性评价. 中国蔬菜, (3): 60-65.
- 宋晰,肖露,林东,王艳辉,李波涛,刘西莉. 2013. 番茄灰霉病菌对腐霉利的抗药性检测及生物学性状研究. 农药学报, 15(4): 398-404.
- 徐作珽,李林,于建垒,赵德友,齐军山. 2001. 蔬菜灰霉病菌对腐霉利抗药性变异及其治理. 植物保护学报, 28(1): 33-38.
- 姚士桐,陆志杰,金周浩,陈利英. 2011. 春季大棚番茄灰霉病发生规律及影响因子分析. 中国农学通报, 27(10): 194-198.
- 詹家绥,吴娥娇,刘西莉,陈凤平. 2014. 植物病原真菌对几类重要单位点杀菌剂的抗药性分子机制. 中国农业科学, 47(17): 3392-3404.
- 张彩凤,李喜燕,李明. 2013. 灰霉病的研究现状与发展趋势. 生命科学仪器, (6): 38-40.
- 张传清,张雅,魏方林,刘少颖,朱国念. 2006. 设施蔬菜灰霉病菌对不同类杀菌剂的抗性检测. 农药学报, 8(3): 245-249.
- 张玮,乔广行,黄金宝,王忠跃,李兴红. 2013. 中国葡萄灰霉病菌对嘧霉胺的抗药性检测. 中国农业科学, 46(6): 1208-1212.
- 张鑫,马雪梅. 2014. 灰霉病菌抗药位点及其分子检测方法研究进展. 生物技术进展, 4(4): 251-257.
- 赵建江,韩秀英,张小凤,马志强,王文桥. 2010. 灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)对苯醚甲环唑的敏感性及其对不同杀菌剂的交互抗药性. 中国农学通报, 26(22): 282-286.
- 赵晓军,张鑫,周建波. 2010. 山西省黄瓜灰霉病菌对腐霉利的抗性检测. 中国蔬菜, (22): 68-72.
- 赵杨,苗则彦,李颖,白元俊. 2014. 番茄灰霉病防治研究进展. 中国植保导刊, (7): 21-29.
- Banno S, Fukumori F, Ichiishi A, Okada K, Uekusa H, Kimura M, Fujimura M. 2008. Genotyping of benzimidazole-resistant and dicarboximide-resistant mutations in *Botrytis cinerea* using real-time polymerase chain reaction assays. *Phytopathology*, 98(4): 397-404.
- Jiang J, Ding L, Michailides T J, Li H, Ma Z. 2009. Molecular characterization of field azoxystrobin-resistant isolates of *Botrytis cinerea*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 93(2): 72-76.
- Leroux P, Fritz R, Debieu D, Albertini C, Lanen C, Bach J, Gredt M, Chapeland F. 2002. Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science*, 58(9): 876-888.
- Ma Z, Michailides T J. 2005. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection*, 24(10): 853-863.
- Ma Z, Yan L, Luo Y, Michailides T J. 2007. Sequence variation in the two-component histidine kinase gene of *Botrytis cinerea* associated with resistance to dicarboximide fungicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88(3): 300-306.
- Rosslensbroich H J, Stuebler D. 2000. *Botrytis cinerea*—history of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Protection*, 19(8): 557-561.
- Zhang C Q, Liu Y H, Ding L, Zhu G N. 2011. Shift of sensitivity of *Botrytis cinerea* to azoxystrobin in greenhouse vegetables before and after exposure to the fungicide. *Phytoparasitica*, 39(3): 293-302.

## Studies on Drug Resistance of Procymidone to Tomato *Botrytis cinerea* at Liaoning Province in 2017

DU Ying, FU Dan-ni, ZHOU Yi-ze, BAI Xue-song, JIANG Zhen, CHENG Gong, JI Ming-shan\*, QI Zhi-qiu\*

(College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, Liaoning, China)

# 北京地区莴苣中番茄斑萎病毒的鉴定

陈东亮<sup>1, 2, 3</sup> 李明远<sup>1, 2, 3</sup> 李雪梅<sup>1, 2, 3</sup> 王玲玲<sup>1, 2, 3, 4</sup> 黄丛林<sup>1, 2, 3\*</sup>

(<sup>1</sup>北京市农林科学院, 北京农业生物技术研究中心, 北京 100097; <sup>2</sup>北京市功能花卉工程技术研究中心, 北京 100097; <sup>3</sup>农业基因资源与生物技术北京市重点实验室, 北京 100097; <sup>4</sup>西藏农牧学院, 西藏林芝 860000)

**摘要:** 番茄斑萎病毒 (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) 是目前已知的寄主范围最广、危害最严重的植物病毒之一。采集北京市顺义地区疑似感染病毒病的莴苣叶片, 症状表现为严重的叶片斑驳褪绿、矮化, 甚至整株枯萎死亡, 发病率可达 25% 以上; 结合发病症状和分子检测技术, 证明其病原为番茄斑萎病毒属的 TSWV。进一步基于 TSWV 外壳蛋白基因序列对不同国家和国内其他地区 TSWV 的进化关系进行了比较分析, 结果显示北京地区莴苣中的 TSWV 与国内已报道的 TSWV 差异较大, 而与西班牙分离的 TSWV 进化关系最近, 表明该 TSWV 病毒非国内其他地区传播, 而是由国外直接输入的病例。

**关键词:** 番茄斑萎病毒; 莴苣; 植物病毒

莴苣 (*Lactuca sativa* L.) 是一种世界性的蔬菜, 也是我国最常见的蔬菜种类之一, 在我国南北各地广泛栽植, 是一种非常重要的经济作物。病毒病是莴苣生产过程中常见的病害, 由于其发病快、防治

难, 往往造成巨大损失。目前已知有十余种植物病毒可以为害莴苣 (Moreno & Fereres, 2012; Ciuffo et al., 2016), 其中番茄斑萎病毒 (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) 由于传播范围广、防治困难而日益成为莴苣生产中危害严重的病害之一。

TSWV 为布尼亚病毒科 (Bunyaviridae) 番茄斑萎病毒属 (*Tospovirus*), 已知至少可以感染 84 个科的 1 090 种植物, 是目前已知的寄主范围最广的植物病毒之一 (Parrella et al., 2003)。TSWV 危害巨大, 对一些农作物甚至会造成毁灭性的损失, 是辣椒 (*Capsicum annuum*)、番茄 (*Lycopersicon esculentum*)、烟草 (*Nicotiana tabacum*)、菊花

陈东亮, 男, 助理研究员, 专业方向: 植物分子生物学, E-mail: dlchen1984@126.com

\* 通讯作者 (Corresponding author): 黄丛林, 研究员, 硕士生导师, 专业方向: 功能花卉新品种培育及其产业化关键技术研发与集成示范, E-mail: conglinh@126.com

收稿日期: 2017-09-12; 接受日期: 2017-11-02

基金项目: 北京市农林科学院创新基金项目 (JNKST201610), 北京市功能花卉工程技术研究中心创新平台项目

**Abstract:** A total of 115 single conidial isolates (*Botrytis cinerea*) were collected, isolated from 8 regions of Liaoning Province. Studies were carried out on determining *Botrytis cinerea* resistance to procymidone by mycelial growth rate method and molecular mechanism of the resistance. The findings indicated that the drug resistance of procymidone to tomato *Botrytis cinerea* had a tendency to accentuate in Liaoning Province, and there were big differences between sensitiveness of *Botrytis cinerea* to procymidone. The current work demonstrated that the EC<sub>50</sub> values of *Botrytis cinerea* to procymidone was between 0.05–16.30 mg · L<sup>-1</sup>, the average value was 3.99 mg · L<sup>-1</sup> and the resistance frequency was 83.48%. Most of the resistant isolates showed middle resistance, and the high resistant isolates were found in Shenyang and Panjin areas. The analysis of resistant bacterial strain *BcOS1* gene sequencing indicated that the amino acid of the selected resistant bacterial strain simultaneously mutated at the position of 369 and 373.

**Key words:** Tomato; *Botrytis cinerea*; Procymidone; Drug resistance; Molecular mechanism