

草莓灰霉病菌对啮酰菌胺抗性及其 *SdhB* 基因序列差异的分子检测

刘欣*, 曾蓉*, 徐丽慧, 高士刚, 戴富明**

(上海市农业科学院生态环境保护研究所, 设施园艺重点实验室, 上海 201403)

摘要: 啮酰菌胺被广泛用于草莓灰霉病的防治, 然而灰葡萄孢菌 (*Botrytis cinerea*) 对啮酰菌胺存在较大的抗性风险, 抗性出现主要与 *SdhB* 基因突变有关。AS-PCR (Allele-specific PCR) 方法常用于检测基因点突变。为明确上海地区草莓灰霉病菌对啮酰菌胺的抗性机制, 2018 年测定了 126 株草莓灰霉病菌中的 61 株抗性菌株与 5 株随机选取敏感菌株的 *SdhB* 基因序列。结果表明, 上海地区草莓灰霉病菌目前已存在 4 种抗性突变类型: P225F、N230I、H272R 和 H272Y, 其中 H272R 和 P225F 为优势突变类型。基于 AS-PCR 原理, 设计及筛选了包含 2 条特异性引物的三引物组, 优化了反应体系, 建立了可通过 1 轮 PCR 反应即可区别啮酰菌胺敏感菌株与 4 种抗性突变菌株的快速检测方法。

关键词: 草莓; 灰葡萄孢; AS-PCR; 啮酰菌胺; 杀菌剂抗性检测

中图分类号: S 668.4

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2019) 11-2155-09

Resistance Mechanism to Boscalid and Molecular Mutation-detection Based on *SdhB* Gene of *Botrytis cinerea* from Strawberry

LIU Xin*, ZENG Rong*, XU Lihui, GAO Shigang, and DAI Fuming**

(Institute of Eco-Environment and Plant Protection, Shanghai Key Laboratory of Protection Horticultural Technology, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China)

Abstract: Boscalid is widely used in control of strawberry gray mold disease. However, it is at a high risk of resistance development for *Botrytis cinerea* to boscalid. The resistance was mainly caused by mutations of *SdhB* gene. The method of AS-PCR (Allele-specific PCR) is always used to detect point mutations in DNA. In order to evaluate the resistance mechanism to boscalid of *Botrytis cinerea* from strawberry in Shanghai, resistance strains in 126 isolates of 2018 were *SdhB*-sequenced. The results showed 4 types of mutations associated to boscalid resistance in Shanghai, P225F, N230I, H272R and H272Y. Among then, H272R and P225F were the dominant type. Therefore, for rapid detection, the tri-primer including 2 specific primers was designed and selected based on AS-PCR principle, and the PCR system was optimized to develop the method, by which the 4 types of mutations could be distinguished from the wild sensitive type in one PCR reaction.

收稿日期: 2019-07-19; **修回日期:** 2019-09-04

基金项目: 上海市瓜果产业技术体系建设项目[沪农科产字(2017)第1号]; 上海市自然科学基金项目(16ZR1424100); 上海市农业科学院卓越团队项目[农科创2018(B-01)]

* 共同第一作者

** 通信作者 Author for correspondence (E-mail: fumingdai@163.com)

Keywords: strawberry; *Botrytis cinerea*; AS-PCR; boscalid; detection of fungicide resistance

草莓灰霉病 (Gray mold disease) 是危害草莓生产和储藏最严重的病害之一 (Fernandez-ortuno et al., 2012)。其病原灰葡萄孢 (*Botrytis cinerea* Pers.) 还可侵染葡萄、黄瓜、番茄等 200 余种作物, 产生软腐、黑腐、霉变等症状, 造成重大经济损失 (Williamson et al., 2007)。琥珀酸脱氢酶抑制剂 (Succinic acid dehydrogenase inhibitor, SDHIs) 是一类含酰胺基团的杀菌剂, 其通过抑制病菌线粒体的电子传递链蛋白复合体 II (琥珀酸脱氢酶, SDH) 活性而起到杀菌效果 (FRAC, 2019a)。啶酰菌胺 (Boscalid) 是 2003 年进入市场的吡啶酰胺类 SDHI, 低毒, 对核盘菌属 (*Sclerotinia* spp.)、链格孢属 (*Alternaria* spp.)、葡萄孢属 (*Botrytis* spp.)、球腔菌属 (*Mycosphaerella* spp.) 等的病原真菌均具较好的抑制活性 (Stammler et al., 2008)。啶酰菌胺对 *B. cinerea* 孢子萌发、芽管伸长、附着胞形成、菌丝生长等均具有高效的抑制作用, 且在植物叶片及茎中具有较好的内吸传导特性 (Stammler et al., 2008), 对草莓灰霉病的田间防治高度有效 (张颂函 等, 2015)。作为草莓灰霉病推荐防治药剂, 啶酰菌胺在上海草莓种植地已有近 10 年的使用历史。

然而, 国际杀菌剂抗性委员会评估认为, *B. cinerea* 对啶酰菌胺产生抗性的风险较大 (FRAC, 2019b)。目前中、美、法、德等多个国家均已发现田间条件下产生的啶酰菌胺高度抗性 *B. cinerea* 群体, 啶酰菌胺的防治效果降低 (Leroux et al., 2010; Fernandez-Ortuño et al., 2012; 赵建江 等, 2018)。2017 年抗性监测结果显示, 上海地区草莓种植园中约 30% 的 *B. cinerea* 对啶酰菌胺产生抗性, 且以高度抗性菌株为主 (刘欣 等, 2018)。已有研究表明, *B. cinerea* 对啶酰菌胺的抗性产生主要与病原菌琥珀酸脱氢酶 *SdhB* 亚基发生位点突变有关, 最常见的突变位点为 225 位点的脯氨酸 (P) 与 272 位点的组氨酸 (H), 包括 P225L/F/T 与 H272Y/R/L 等突变类型 (de Miccolis Angelini et al., 2010; Leroux et al., 2010; Panebianco et al., 2015), 其中 H272Y 及 H272R 最常见 (Veloukas et al., 2011; Yin et al., 2011), 且突变多数情况下导致菌株对啶酰菌胺产生中度到高度抗性 (Leroux et al., 2010; Fernandez-ortuno et al., 2012; 刘欣 等, 2018)。AS-PCR (Allele-specific PCR) 是目前病原菌对杀菌剂抗性突变分子检测中常用的方法之一。AS-PCR 的原理是通过特异位点处的 PCR 引物 3' 端与模板完全及不完全配对的扩增效率差异, 确定该特异位点的突变情况 (Ye et al., 1992)。通常运用 1 个包含多条引物的 PCR 反应对 1 个特异位点的 1 种突变或 1 个单核苷酸多态性 (SNP) 进行检测 (Liu et al., 1997)。此方法具有简单、快速、准确等优点, 被用于葡萄霜霉病菌 (*Plasmopara viticola*) 对烯酰吗啉 (Dimethomorph)、葡萄灰霉病菌 (*B. cinerea*) 对苯并咪唑类药剂 (Benzimidazole) 等抗性的快速检测 (Muñoz et al., 2009; Zhang et al., 2017)。

对上海市 6 个主要草莓生产区域来源的抗性 *B. cinerea* 的 *SdhB* 基因进行测序, 以明确抗性机制, 并根据已发现的 4 种抗性突变类型, 基于 AS-PCR 的技术原理, 分别设计及筛选得到 2 条特异性引物, 并对 PCR 反应体系进行优化, 建立通过 1 轮 PCR 反应鉴别出 4 种抗性突变类型的快速检测方法, 以期对 *B. cinerea* 对啶酰菌胺抗性的快速检测提供理论依据及技术方法。

1 材料与方 法

1.1 供试菌株、试剂及培养基

2018 年 1—5 月, 从上海市浦东新区、青浦区、金山区、奉贤区、嘉定区和崇明区的多年施用

啶酰菌胺的 14 个草莓种植基地采集具典型灰霉病症状的草莓病果(其中崇明区的种植基地较少使用啶酰菌胺)。采用孢子液稀释分离法 (Fernandez-ortuno et al., 2012) 得到纯化的单孢菌株, 来源于同一病果的病菌保留 1 株。病菌于马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (Potato dextrose agar, PDA, 美国 BD 公司) 上 24 °C 黑暗培养, 7~10 d 产生分生孢子, 共计获得 126 株产孢病菌用于试验。

啶酰菌胺 (Boscalid, 上海悦联化工有限公司) 为 98% 原药。丙酮 (国药集团化学试剂有限公司) 为分析纯。水琼脂培养基 (Water agar, WA): 琼脂 15 g、无菌水 1 000 mL, 用于病菌孢子萌发抑制试验。PCR EasytaqSuperMix (北京全式金生物技术有限公司) 用于目的基因克隆及点突变检测 AS-PCR 扩增。琼脂糖 (上海翊圣生物科技有限公司) 用于琼脂糖凝胶电泳。

1.2 草莓灰霉病菌对啶酰菌胺的敏感性测定

将啶酰菌胺原药溶于丙酮配成 $50 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 母液, 用丙酮梯度稀释配成终浓度为 1、5 和 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的含药 WA 平板。于 PDA 培养基 24 °C 培养菌株产孢后 (约 7 d), 从培养皿上刮取新鲜的分生孢子于无菌水中, 调节孢子悬浮液浓度至 10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$, 取 100 μL 均匀涂布于含药 WA 平板上。24 °C 黑暗条件下倒置培养 18 h 后, 在光学显微镜下记录萌发的孢子数及观察孢子总数。以芽管长度超过孢子宽度为萌发。每菌株每个浓度重复 2 次, 每个重复观察的孢子总数不低于 200 个。以添加等量丙酮 (1%) 的 WA 平板为空白对照。根据 Fernández-Ortuño 等 (2012) 的标准, 将分生孢子于含 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 啶酰菌胺的 WA 平板上能正常萌发的菌株 (萌发抑制率 < 50%, $\text{EC}_{50} > 50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 归为抗性菌株 (R); 反之 (萌发抑制率 $\geq 50\%$, $\text{EC}_{50} \leq 50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 则为敏感菌株 (S)。应用 IBM SPSS 19.0 软件对萌发抑制率进行均值及标准差的计算, 对数据进行邓肯氏新复极差法多重比较。

1.3 草莓灰霉病菌对啶酰菌胺的抗性机制研究

对已鉴定出的全部 61 株抗性菌株, 及随机选取的 5 株敏感菌株的琥珀酸脱氢酶 B 亚基编码基因 (*SdhB*) 序列进行测定。菌丝预处理及总 DNA 提取参考 Harju 等 (2004) 的方法。PCR 扩增引物为 SdhB-F: 5'-TCGAACCTACTCGCCCTATCCAATT-3', SdhB-R: 5'-GACTTCTTAGAAAGCCATTTCCTTC-3'。PCR 产物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序。测序结果用 NCBI 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) BLASTn 进行比对, 得出突变碱基。

1.4 抗药性分子检测体系的优化与建立

1.4.1 引物设计

基于 AS-PCR 原理 (Ye et al., 1992; Liu et al., 1997), 设计针对 3 个位点的 4 种突变类型 (P225F、N230I、H272R 和 H272Y) 的三引物 PCR 检测体系, 使该体系能特异性扩增未发生突变位点处的条带。将 *SdhB* 亚基的 225 (Phe, CCC) 及 272 (His, CAC) 位点分别设置在引物 3' 端, 初步得到两条长度为 24 bp 的特异性下游引物, 其中以 225 位点为 3' 端的引物序列中包括 230 位点 (Asn, AAC)。两条下游引物包含 3 个突变位点的完整的密码子碱基。使用 NCBI 网站 Primer-Blast 模块, 筛选与下游引物退火温度相近的一条可共用的上游引物。上游引物 (EX-F) 序列为: 5'-CTTCAACA CACCGACCCAGC-3', 位于 225 氨基酸位点上游 98~117 bp 处, 在 272 位点上游 239~258 bp 处。

1.4.2 引物优化与筛选

为提高引物特异性, 在两条初步设计的下游引物中的 225、230 及 272 位点附近设置额外的错配位点, 进行试验。引物设计时, 保持 225 及 272 位点处的氨基酸的第一和第二位密码子保持与野生

型相同，以避免这两处高频突变位点的其他突变类型的干扰。

从 126 株病菌中，选取 8 株不同抗性机制的病菌及 2 株野生敏感型病菌，用于分子检测体系的验证（表 1）。

表 1 用于分子检测体系建立的灰霉病菌菌株

Table 1 *Botrytis cinerea* strains for validation of the molecular detection system

菌株来源 Source of strain	菌株代号 Strain code	抗性表型 Resistance phenotype	<i>SdhB</i> 亚基突变类型 Substitutions in <i>SdhB</i>
浦东新区 Pudong New District	PD31	抗性 Resistance	P225F (CCC to TTC)
青浦区 Qingpu District	QP61	抗性 Resistance	P225F (CCC to TTC)
浦东新区 Pudong New District	PD32	抗性 Resistance	N230I (AAC to ATC)
浦东新区 Pudong New District	PD33	抗性 Resistance	N230I (AAC to ATC)
金山区 Jinshan District	JS41	抗性 Resistance	H272R (CAC to CGC)
金山区 Jinshan District	JS44	抗性 Resistance	H272R (CAC to CGC)
奉贤区 Fengxian District	FX35	抗性 Resistance	H272Y (CAC to TAC)
奉贤区 Fengxian District	FX37	抗性 Resistance	H272Y (CAC to TAC)
崇明区 Chongming District	CM41	敏感 Sensitive	无 None
崇明区 Chongming District	PD41	敏感 Sensitive	无 None

首先，对 272 位点处下游引物进行筛选。当 272 位点未突变菌株能扩增出 282 bp 条带，而 H272R 及 H272Y 抗性突变菌株不能扩增出条带，或条带明显较暗时，认为该引物特异性较高。在此基础上，在上游引物 EX-F 及 272 特异引物体系中，再加入 225 及 230 位点特异下游引物，进行筛选。仅当 P225F 及 N230I 抗性突变菌株的 DNA 模板扩增出一条 282 bp 条带，H272R 及 H272Y 抗性突变菌株扩增出一条 141 bp 条带，而野生型敏感病菌能同时扩增出 141 bp 和 282 bp 条带时，认为该引物组特异性较高。

引物筛选的 PCR 体系为 20 μL，含 1/2 体积的 2× PCR SuperMix、引物各 0.25 μmol 及 DNA 20 ng。PCR 程序为：预变性 95 °C 3 min；95 °C 20 s，55 °C 20 s，72 °C 30 s，32 个循环；72 °C 延伸 5 min。PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳。

1.4.3 体系的优化与建立

用表 1 中 10 株病菌对引物对、PCR 退火温度及循环数进行优化试验，选择较优引物组合进行试验。退火温度分别为 51、53、55 和 57 °C，从中选择最优温度；并根据条带亮度，调整循环数。从中选取最优组合及扩增条件建立检测方法。

PCR 体系及其他程序与上述相同。每个试验至少重复两次。应用此方法检测其余草莓灰霉病菌，用孢子萌发敏感性及测序数据进行验证。

2 结果与分析

2.1 上海地区草莓灰霉病菌对啶酰胺的抗性及其 *SdhB* 基因的序列差异

2018 年采集的 126 株草莓灰霉病菌的孢子萌发敏感性检测结果（表 2）表明，其中 65 株病菌对啶酰菌胺敏感，61 株病菌对啶酰菌胺表现为抗性，且抗性与敏感病菌孢子萌发敏感性差异较大。在对啶酰菌胺敏感的 65 株病菌中随机选取 5 株，对其 *SdhB* 进行测序，结果表明，均未发生突变；61 株抗性病菌的 *SdhB* 基因均发生突变，其中 30 株菌株 *SdhB* 亚基 272 位组氨酸突变为精氨酸（H272R，CAC 突变为 CGC），23 株菌株 225 位脯氨酸突变为苯丙氨酸（P225F，CCC 突变为 TTC），6 株菌

株 230 位天冬酰胺突变为异亮氨酸 (N230I, AAC 突变为 ATC), 2 株菌株 272 位组氨酸突变为酪氨酸 (H272Y, CAC 突变为 TAC) (图 1)。H272R 与 P225F 突变发生普遍且频率高, 占优势地位 (表 3)。

表 2 126 株灰霉病菌对啮酰菌胺的敏感性
 Table 2 Sensitivity of 126 *Botrytis cinerea* strains to Boscalid

啮酰菌胺/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) Boscalid	分生孢子萌发抑制率/% Inhibition of conidial germination	抗性表型 Resistance phenotype	菌株数 Sum of stain
1	1.6 ± 2.4 d	抗性 Resistance	61
5	2.3 ± 2.0 cd	抗性 Resistance	61
50	4.0 ± 4.4 c	抗性 Resistance	61
1	93.6 ± 12.3 b	敏感 Sensitive	65
5	100.0 a	敏感 Sensitive	65
50	100.0 a	敏感 Sensitive	65

注: 萌发率数据为平均值 ± 标准差, 数据间不同字母表明存在 $P < 0.05$ 水平的显著性差异, 显著性由邓肯氏新复极差法分析得到。
 Note: Date is mean ± SD, the different letters in the column indicate significant different at $P < 0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

```

                721                                750  860                                874
P225F ...CATCTTCTTCTCCTACTGGTGGAACAGTG.....GTACAGATGTCACAC...
N230I ...CATCCCCTTCTCCTACTGGTGGATCAGTG.....GTACAGATGTCACAC...
H272R ...CATCCCCTTCTCCTACTGGTGGAACAGTG.....GTACAGATGTCGCAC...
H272Y ...CATCCCCTTCTCCTACTGGTGGAACAGTG.....GTACAGATGTTACAC...
Wild type ...CATCCCCTTCTCCTACTGGTGGAACAGTG.....GTACAGATGTCACAC...
    
```

图 1 草莓灰霉病菌 *SdhB* 基因序列差异

突变位点标记为斜体加粗。

Fig. 1 The difference of *SdhB* of *Botrytis cinerea* strains from strawberry

The mutation sites are marked in italic bold.

表 3 上海地区草莓灰霉病菌对啮酰菌胺的抗性突变及分布

Table 3 Resistance mutations and distributions of *Botrytis cinerea* isolates from strawberry to Boscalid in Shanghai

菌株来源 Source of strain	菌株数 Sum of strain	抗性菌株数 Number of resistant strain	<i>SdhB</i> 亚基突变类型 Substitutions in <i>SdhB</i>			
			P225F (CCC to TTC)	N230I (AAC to ATC)	H272R (CAC to CGC)	H272Y (CAC to TAC)
浦东新区 Pudong New District	14	5	1	4	0	0
青浦区 Qingpu District	36	24	12	0	12	0
金山区 Jinshan District	32	10	0	1	9	0
奉贤区 Fengxian District	18	15	10	1	2	2
嘉定区 Jiading District	14	7	0	0	7	0
崇明区 Chongming District	12	0	0	0	0	0
总计 Total	126	61	23	6	30	2

2.2 三引物 PCR 抗药性检测体系的优化与建立

通过 *SdhB* 亚基 272 位点特异性引物的设计和筛选 (表 4), 得到特异性较高、目的产物条带较明亮的引物 272-R4 (图 2)。

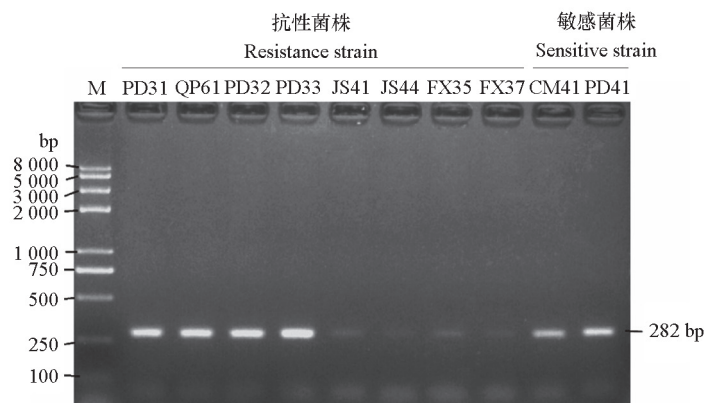
在上游引物及 272 位点特异性引物 272-R4 的体系中, 加入 225 及 230 位点的备选引物进行筛选 (表 4), 得到较理想的 225 与 230 位点特异性引物 (225-R10)。

表 4 *SdhB* 基因点突变的特异性引物的设计与筛选Table 4 Design and selection of primers specific to point mutation of specific codons on *SdhB*

目标密码子 Codon	PCR 试验体系中其他引物 Other primers in PCR system	试验引物 Testing primer	引物序列 (5' - 3') Sequence	特异性 Specificity	产物 Yield
272	EX-F	272-R1	CCTCGAGCAGTTGAGAATAG AGTG	-	-
		272-R2	CCTCGAGCAGTTGAGAATA CAGTG	-	-
		272-R3	CCTCGAGCAGTTGAGAAT CGAGTG	+	+
		272-R4	CCTCGAGCAGTTGAGAATAG ACTG	++	+++
		272-R5	CCTCGAGCAGTTGAGAATAG GTTG	++	++
		272-R6	GTCCTCGAGCAGTTGAGAATAG ACTG	+	+
		272-R7	GTCCTCGAGCAGTTGAGAATAG GTTG	+	+
225, 230	EX-F, 272-R4	225-R1	CCTCACTGTCCACCAGT TGCAGG	-	-
		225-R2	CTCACTGT TAC CACCAGT TGCAGGG	-	-
		225-R3	CTCACTGT TAC CACCAGT TGCAGGG	-	-
		225-R4	CTCACTGT TAC CACCAG A C G T G G G	-	-
		225-R5	CTCACTGT TGC CACCAG G A G G A G G	-	-
		225-R6	CTCACT TTGAG ACCAGTAG CAAGG	-	-
		225-R7	CTCACT TTGAC ACC TGTAGCAAGG	-	-
		225-R8	CTCA CT TTGAC CACCAGTAG CAAGG	-	-
		225-R9	CTCA CT TTG CACCAGTAG CAAGG	+	+
		225-R10	CTCA CTG TTG CACCAGTAG CAAGG	++	++
		225-R11	CTCA CTGT TCC CACCAGTAG CAAGG	-	-

注：引物中灰色阴影部分为抗性突变位点，具下划线的斜体字为引物中设计的错配位点。特异性指该引物组是否能扩增出正确条带的特性，“-”条带不正确，“+”具正确条带但出现明显的错误条带，“++”具正确条带但出现微弱的错误条带，“+++”条带完全正确。产物指正确条带的相对亮度，“-”无条带，“+”条带微弱，“++”条带较明亮，“+++”条带十分明亮。下同。

Note: The sequences of primers with gray shadow are the position of mutations for resistance. Italics characters with underlines are the extra mismatches introduced. The specificity is defined as amplification of only the expected band “-”, completely false amplification “+”, the expected bands with remarkable false bands. “++”, the expected bands, with weak or vague wrong bands. “+++”, only the expected band. The yield is directed to the relative yield of the specific products. “-”, no band. “+”, weak band. “++”, strong band. “+++”, very strong band. The same below.

图 2 *SdhB* 亚基蛋白 272 突变检测引物 (272-R4) 的特异性Fig. 2 The specificity of the primer (272-R4) for mutations detection of 272 codon on *SdhB*

将三引物体系的引物对、退火温度和循环数进行优化，结果表明引物 EX-F、225-R10 与 272-R4，在退火温度为 53 °C，PCR 循环数为 32 时，检测特异性最高，产物条带最明亮（表 5，图 3）。在此三引物 PCR 体系下，能够成功检测 3 个突变位点的 4 种抗性突变类型，P225F 及 N230I 抗性突变菌株（PD31、QP61 及 PD32、PD33）的 DNA 模板仅能扩增出一条 282 bp 条带，H272R 及 H272Y 抗性突变菌株（JS41、JS44 及 FX35、FX37）仅能扩增出一条 141 bp 条带，而野生型敏感病菌（CM41、PD41）能同时扩增出 141 和 282 bp 两条带（图 3）。

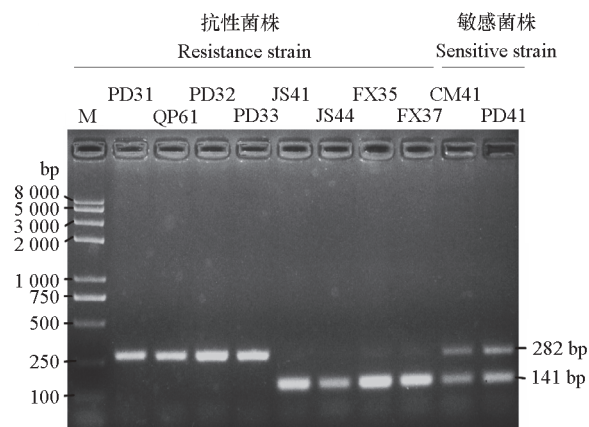


图3 三引物 PCR 的草莓灰霉病菌对啶酰菌胺抗性检测体系

Fig. 3 Tri-primer PCR detection system for boscalid resistance

应用此体系检测 2018 年上海地区采集的 126 株草莓灰霉病菌, 结果表明此体系能有效检测抗性突变位点, 从而鉴别抗性及敏感病菌, 且得到的结果与病菌孢子萌发敏感性及测序结果完全一致, 表明此方法准确、稳定, 适合用于灰霉病菌的啶酰菌胺抗性检测。

3 讨论

本研究对 2018 年采自上海地区的 61 株啶酰菌胺抗性 *B. cinerea* 的 *SdhB* 测序结果表明, 存在 4 种抗性突变类型: P225F、N230I、H272R 和 H272Y, 其中 H272R 和 P225F 占优势, 且这 4 种突变 *B. cinerea* 菌株的分生孢子萌发对啶酰菌胺的敏感性均较低, 啶酰菌胺抑制其孢子萌发的 EC_{50} 值均 $> 50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。已有研究表明, *B. cinerea* 的 *SdhB* 基因 225 和 272 位点为啶酰菌胺抗性突变热点, 较易在人工紫外条件下诱导的抗性突变 (Stammler et al., 2008)。225 位点的脯氨酸 (P) 是琥珀酸脱氢酶泛醌结合位点 (Quinone-binding site, Q-site, Q 位点) 中疏水残基的组成部分。当发生 P225L、P225F 或 P225T 突变时, 被推测由于脯氨酸疏水残基被体积较大的亮氨酸、苯丙氨酸, 或被体积较小的苏氨酸替代, 使得 225 位点附近的构型发生改变, 从而降低了啶酰菌胺结合 Q 位点的亲和性 (Stammler et al., 2008; Scalliet et al., 2011)。272 位点的组氨酸 (H) 侧链位于 Q 位点。SDHs 通过组氨酸的氢键与 Q 位点的结合, 因此 272 位点处组氨酸的突变也被预测与 SDHs 结合的亲和性降低有关 (Horsefield et al., 2006; Stammler et al., 2008; Scalliet et al., 2011)。本研究中发现 3 种 225 或 272 位点的抗性突变之外, 还发现较少见的 N230I 突变。

病原菌对杀菌剂的敏感性检测是制定病害科学防控策略的重要基础工作 (FRAC, 2019c)。目前最常用的抗性检测手段为传统的平皿法, 通过检测病原菌菌丝生长或孢子萌发对杀菌剂的敏感性, 并对比敏感基线, 得到病原菌抗性表型。但平皿法涉及病原菌的菌丝培养、产孢诱导等, 步骤繁琐, 耗时较长, 且需要敏感基线、抗性分级等作为参考标准 (FRAC, 2019c)。AS-PCR、限制性长度多态性 (PCR-restriction fragment length polymorphism, RFLP)、熔解曲线分析法 (High resolution melting assay, HRM-PCR) 等基于抗性突变检测的分子生物学技术也常用于杀菌剂抗性检测。Luck 和 Gillings (1996) 使用 RFLP 及 AS-PCR 法成功建立了基于 β -微管蛋白 E198A 突变检测的 *B. cinerea* 苯菌

表5 用于草莓灰霉病菌对啶酰菌胺抗性检测的三引物 PCR 反应体系的优化与建立

Table 5 Optimization and establishment of the tri-primer PCR system for boscalid resistance detection

特异性引物 Specific primers	上游引物 Forward primer		退火温度/ °C T_m	循环数 Cycles	特异性 Specificity	产物 Yield
	225 & 230 codons	272 codon				
EX-F	225-R9	272-R4	55	34	+	+
EX-F	225-R9	272-R5	55	34	-	-
EX-F	225-R10	272-R4	57	32	-	-
EX-F	225-R10	272-R4	55	32	++	++
EX-F	225-R10	272-R4	53	32	+++	+++
EX-F	225-R10	272-R4	51	32	+	++
EX-F	225-R10	272-R4	53	30	++	++
EX-F	225-R10	272-R4	53	34	++	+++
EX-F	225-R10	272-R5	55	34	+	++
EX-F	225-R10	272-R5	55	32	+	++
EX-F	225-R10	272-R5	53	34	++	+
EX-F	225-R10	272-R5	53	32	++	++

灵 (Benomyl) 抗性检测体系。Chatzidimopoulos 等 (2014) 运用 HRM-PCR 法, 根据野生菌株与突变菌株的实时定量 PCR 熔解曲线形状的差异, 建立了 *B. cinerea* 琥珀酸脱氢酶 *SdhB* 亚基上啶酰菌胺与环酰菌胺 (Fenhexamid) 抗性突变 H272R、H272Y 的鉴别方法。

为快速检测上海地区已发现的 P225F、N230I、H272R 和 H272Y 抗性突变, 根据 AS-PCR 的原理, 建立了上述 4 种抗性突变的 PCR 检测法, 且其检测结果与菌株抗性表型或测序结果完全一致。常规的 AS-PCR 或在其基础上建立的 ARMS-PCR (Tetra-primer amplification refractory mutation system) 中, 1 个反应仅能检测 1 种突变类型或 SNP (Ye et al., 1992; Liu et al., 1997)。ARMS-PCR 法具有更高的准确度, 且在检测突变的同时具有识别纯合子和杂合子的功能 (Zhang et al., 2017)。AS-PCR 与其他分子检测方法相比, 操作更简单, 仅使用常规 PCR 的实验操作及仪器就能实现 (Liu et al., 1997)。而本研究建立的方法与常规的 AS-PCR 或 ARMS-PCR 相比更具有一定的优势。第一, 此方法能同时检测多个位点突变, 应用范围更广, 体系包含的 2 条特异引物涉及多个抗性突变位点, 且经过反应体系的优化, 能在一轮反应中同时发生特异性扩增反应。第二, 此体系的特异引物设计具有检测这两个高频突变位点上其他突变类型的潜力, 特异引物针对野生型敏感菌株 *SdhB* 的 225 及 272 位点, 其他突变的发生亦可能导致该位点的特性条带无法被成功扩增, 从而检测到该突变。第三, 此方法的引物设计更精简, 使检测结果更简洁明了, 体系共具 3 条引物, 检测结果可仅由电泳图上条带的数量进行判断 (2 条为敏感菌株, 1 条为抗性菌株)。而 ARMS-PCR 体系共含 4 条引物, 结果需通过电泳图上条带的不同大小进行鉴别 (Liu et al., 1997; Zhang et al., 2017)。与 ARMS-PCR 相比, 不足之处为, 仅适用于单孢纯化的 *B. cinerea*, 混合菌样可能导致条带重叠, 出现假阴性。

为了草莓灰霉病的高效防治及杀菌剂的科学使用, *B. cinerea* 对啶酰菌胺的敏感性监测工作仍需要在更多生产果园中进行。对于是否存在未检测到的抗性突变类型, 以及本检测方法是否适用于更多突变类型的检测等, 仍有待进一步验证。

References

- Chatzidimopoulos M, Ganopoulos I, Madesis P, Vellios V, Tsaftaris A, Pappas A C. 2014. High-resolution melting analysis for rapid detection and characterization of *Botrytis cinerea* phenotypes resistant to fenhexamid and boscalid. *Plant Pathology*, 63 (6): 1336 - 1343.
- de Miccolis Angelini R M, Habib W, Rotolo C, Pollastro S, Faretra F. 2010. Selection, characterization and genetic analysis of laboratory mutants of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) resistant to the fungicide boscalid. *European Journal of Plant Pathology*, 128 (2): 185 - 199.
- Fernandez-Ortuño D, Chen F P, Schnabel G. 2012. Resistance to pyraclostrobin and boscalid in *Botrytis cinerea* isolates from strawberry fields in the Carolinas. *Plant Disease*, 96 (8): 1198 - 1203.
- Fungicide Resistance Action Committee (FRAC). 2019a. Publications: FRAC code list 2018: fungicides sorted by mode of action [EB/OL]. [2019-01-01]. <http://www.frac.info/publications>.
- Fungicide Resistance Action Committee (FRAC). 2019b. Publications: pathogen risk list [EB/OL]. [2019-01-01]. <http://www.frac.info/publications>.
- Fungicide Resistance Action Committee (FRAC). 2019c. Publications: sensitivity baselines in fungicide resistance research and management [EB/OL]. [2019-01-01]. <http://www.frac.info/publications>.
- Harju S, Fedosyuk H, Peterson K R. 2004. Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n' Grab. *BMC Biotechnology*, 4: 8.
- Horsefield R, Yankovskaya V, Sexton G, Whittingham W, Shiomi K, Omura S, Byrne B, Cecchini G, Iwata S. 2006. Structural and computational analysis of the quinone-binding site of complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase) a mechanism of electron transfer and proton conduction during ubiquinone reduction. *Journal of Biological Chemistry*, 281 (11): 7309 - 7316.
- Leroux P, Gredt M, Leroch M, Walker A S. 2010. Exploring mechanisms of resistance to respiratory inhibitors in field strains of *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mold. *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (19): 6615 - 6630.

- Liu Xin, Wu Yan, Cheng Wei, Zeng Rong, Xu Li-hui, Gao Shi-gang, Dai Fu-ming. 2018. Sensitivity and resistance mechanism to boscalid of *Botrytis cinerea* from strawberry in Shanghai. Chinese Journal of Pesticide Science, 20 (4): 452 - 458. (in Chinese)
- 刘欣, 吴雁, 成玮, 曾蓉, 徐丽慧, 高士刚, 戴富明. 2018. 上海地区草莓灰霉病菌对啞酰菌胺的敏感性检测及抗性机制分析. 农药学报, 20 (4): 452 - 458.
- Liu Q, Thorland E C, Heit J A, Sommer S S. 1997. Overlapping PCR for bidirectional PCR amplification of specific alleles: a rapid one-tube method for simultaneously differentiating homozygotes and heterozygotes. Genome Research, 7 (4): 389 - 398.
- Luck J E, Gillings M R. 1996. Rapid identification of benomyl resistant strains of *Botrytis cinerea*, using the polymerase chain reaction. Mycological Research, 99 (12): 1483 - 1488.
- Muñoz C, Gómez T S, Volpe M L. 2009. Tetraprimer ARMS-PCR for identification of SNP in beta-tubulin of *Botrytis cinerea*, responsible of resistance to benzimidazole. Journal of Microbiological Methods, 78 (2): 245 - 246.
- Panbianco A, Castello I, Cirvilleri G, Perrone G, Epifani F, Ferrara M, Polizzi G, Walters D R, Vitale A. 2015. Detection of *Botrytis cinerea* field isolates with multiple fungicide resistance from table grape in Sicily. Crop Protection, 77: 65 - 73.
- Scalliet G, Boehler M, Bowler J, Green P S, Kilby P, Fonne-Pfister R. 2011. SDHIs and the fungal succinate dehydrogenase. Modern fungicides and antifungal compounds VI. 16th International Reinhardtsbrunn Symposium, Braunschweig: Deutsche Phytomedizinische Gesellschaften. V. Verlag: 171 - 178.
- Stammler G, Brix H D, Nave B, Gold R, Schoefl U. 2008. Studies on the biological performance of boscalid and its mode of action. Modern fungicides and antifungal compounds V: 15th International Reinhardtsbrunn Symposium, Braunschweig: Deutsche Phyto-medizinische Gesellschaften. V. Verlag: 45 - 51.
- Veloukas T, Leroch M, Hahn M, Karaoglanidis G S. 2011. Detection and molecular characterization of boscalid-resistant *Botrytis cinerea* isolates from strawberry. Plant Disease, 95 (10): 1302 - 1307.
- Williamson B, Tudzynski B, Tudzynski P, van Kan J A. 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. Molecular Plant Pathology, 8 (5): 561 - 580.
- Ye S, Humphries S, Green F. 1992. Allele specific amplification by tetra-primer PCR. Nucleic Acids Research, 20 (5): 1152.
- Yin Y N, Kim Y K, Xiao C L. 2011. Molecular characterization of boscalid resistance in field isolates of *Botrytis cinerea* from apple. Phytopathology, 101 (8): 986 - 995.
- Zhang H, Kong F, Wang X, Liang L, Schoen C D, Feng J, Wang Z. 2017. Tetra-primer ARMS-PCR for rapid detection and characterization of *Plasmopara viticola* phenotypes resistant to carboxylic acid amide fungicides. Pest Management Science, 73 (8): 1655 - 1660.
- Zhang Song-han, Chen Xiu, Zhao Li, Yan Wei-zhong, Fang Chao-yang. 2015. Evaluation of control efficacy of six fungicides against gray mold rot of strawberry. World Pesticides, 37 (5): 47 - 49. (in Chinese)
- 张颂函, 陈秀, 赵莉, 颜伟中, 方朝阳. 2015. 6种杀菌剂防治草莓灰霉病的田间药效评价. 世界农药, 37 (5): 47 - 49.
- Zhao Jian-jiang, Lu Fen, Wu Jie, Ma Zhi-qiang, Han Xiu-ying, Wang Wen-qiao. 2018. Sensitivity of *Botrytis cinerea* from greenhouses in Hebei Province to boscalid and fludioxonil. Acta Phytopathologica Sinica, 48 (6): 817 - 821. (in Chinese)
- 赵建江, 路粉, 吴杰, 马志强, 韩秀英, 王文桥. 2018. 河北省设施番茄灰霉病菌对啞酰菌胺和咯菌腈的敏感性. 植物病理学报, 48 (6): 817 - 821.