

北京地区草坪草夏季斑枯病菌对嘧菌酯的敏感性 及其 *Cytb* 序列分析

胡 健, 杨静雅, 李 婕, 杨高文, 任海彦*

(南京农业大学 草业学院, 南京 210095)

摘 要: 采用菌丝生长速率法, 测定了水杨脲酸 (SHAM) 对草坪草夏季斑枯病菌 *Magnaporthe poae* 菌丝生长及其对嘧菌酯敏感性的影响, 并在此基础上测定了采自北京地区的 114 株夏季斑枯病菌对嘧菌酯的敏感性; 扩增并分析了夏季斑枯病菌细胞色素 *b* 基因 (*Cytb*) 部分序列, 以期探寻该病原菌对嘧菌酯敏感性下降的分子机制。结果显示: 不同浓度 SHAM 对菌丝生长的抑制作用差异显著 ($F = 20.812$, $P < 0.0001$); 添加 SHAM (40 $\mu\text{g/mL}$) 与否, 嘧菌酯对菌丝生长的抑制中浓度 (EC_{50}) 无显著差异 ($F = 0.0410$, $P = 0.8423$)。嘧菌酯对供试 114 株菌株的 EC_{50} 值范围为 0.0010~0.1465 $\mu\text{g/mL}$, 平均值为 $(0.0174 \pm 0.0261) \mu\text{g/mL}$ 。供试夏季斑枯病菌对嘧菌酯的敏感性频率不符合正态性分布 ($W = 0.4997$, $P < 0.05$), 表明群体中已出现对嘧菌酯敏感性下降的亚群体; 连续单峰频次分布为 70.18% 的菌株 ($W = 0.9708$, $P = 0.0640 > 0.05$) 的平均 EC_{50} 值为 $(0.0078 \pm 0.0037) \mu\text{g/mL}$, 该值可作为夏季斑枯病菌对嘧菌酯的相对敏感性基线。比对分析获得夏季斑枯病菌 *Cytb* 的部分序列 (8639 bp), 进一步扩增发现对嘧菌酯敏感性存在差异的 12 株菌株均在该序列上紧临 143 位密码子处插入了一段长 1956 bp 的内含子, 且在 *Cytb* 的 129、137 和 143 位密码子上未出现与抗性相关的点突变。上述结果可为草坪草夏季斑枯病的有效防治提供依据, 同时可为深入探寻病原菌对甲氧基丙烯酸酯类 (QoIs) 杀菌剂敏感性下降的分子机制提供参考。

关键词: 草坪草; 夏季斑枯病; 夏季斑枯病菌; 嘧菌酯; 敏感性; 抗性; 细胞色素 *b*

中图分类号: S481.4; S482.4 文献标志码: A 文章编号: 1008-7303(2018)01-0033-08

Azoxystrobin sensitivity in *Magnaporthe poae* populations collected from turfgrass in Beijing and analysis of its cytochrome *b* (*Cytb*) gene sequence

HU Jian, YANG Jingya, LI Jie, YANG Gaowen, REN Haiyan*

(College of Agro-grassland Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The effect of salicylhydroxamic acid (SHAM) on mycelial growth of *Magnaporthe poae* from turfgrass and *in vitro* azoxystrobin sensitivity were determined by mycelial growth rate method. Thereafter, the sensitivities of 114 *M. poae* isolates to azoxystrobin were determined by the same method. The partial sequence of *M. poae* cytochrome *b* (*Cytb*) gene was cloned and analyzed to

收稿日期: 2017-11-16; 录用日期: 2017-12-26.

基金项目: 国家自然科学基金 (31701810); 江苏省自然科学基金 (BK20160725).

作者简介: 胡健, 男, 博士, 讲师, 主要从事有益微生物开发利用及草地病害防治, E-mail: jaffyhu@njau.edu.cn; *任海彦, 通信作者 (Author for correspondence), 女, 博士, 讲师, 主要从事草地微生态与植被恢复研究, E-mail: hren@njau.edu.cn

investigate the molecular mechanism of the decreased sensitivity to azoxystrobin in *M. poae*. The results showed that the inhibition of mycelial growth by SHAM solution of different concentrations was significantly different ($F = 20.812$, $P < 0.000\ 1$). Sensitivity of *M. poae* to azoxystrobin amended with SHAM (40 $\mu\text{g/mL}$) was not significantly different from that without SHAM ($F = 0.041\ 0$, $P = 0.842\ 3$). The effective concentration for 50% inhibition of mycelial growth (EC_{50}) values of the tested isolates ranged from 0.001 0-0.146 5 $\mu\text{g/mL}$, and the average of EC_{50} values was (0.017 4 $\pm$ 0.026 1) $\mu\text{g/mL}$. The frequency of azoxystrobin sensitivity in *M. poae* was not normally distributed ($W = 0.499\ 7$, $P < 0.05$), suggesting that sub-populations of decreased sensitivity to azoxystrobin in *M. poae* emerged. The majority of *M. poae* isolates (70.18%) have the frequency of EC_{50} values with unimodal curve distribution ($W = 0.970\ 8$, $P = 0.064\ 0 > 0.05$), and the mean EC_{50} value of these isolates was (0.007 8 $\pm$ 0.003 7) $\mu\text{g/mL}$, which can be used as a relative sensitivity baseline. A partial sequence of *M. poae* *Cytb* gene (8 639 bp) was obtained by aligning to the reference mitochondrial genome of *M. poae*. Sequence analysis revealed the presence of a 1 956 bp intron immediately downstream of codon 143. The intron was identified in all 12 isolates of *M. poae* *Cytb* with different sensitivity to azoxystrobin, and no point mutations were observed at codons 129, 137 and 143, which were responsible for azoxystrobin resistance reported previously. The results will lay a scientific basis for the effective management of summer patch disease and provide a useful reference for further investigating the molecular mechanism of the decreased sensitivity to QoIs in *M. poae*.

Keywords: turfgrass; summer patch; *Magnaporthe poae*; azoxystrobin; sensitivity; resistance; cytochrome *b*

夏季斑枯病是草坪上一种重要的根部病害,常引起草坪草叶尖枯死及根部坏死,最终在草坪上形成大小不一的圆形或蛙眼状黄褐色斑块,由于该病害主要发生在高温高湿的夏季,因此得名夏季斑^[1]。夏季斑枯病主要由真菌 *Magnaporthe poae* Landschoot & Jackson 引起,称为夏季斑枯病菌,该菌主要侵染冷季型草坪草,包括一年生早熟禾 *Poa annua* L.、草地早熟禾 *Poa pratensis* L.、羊茅 *Festuca* spp. 和匍匐翦股颖 *Agrostis palustris* Huds.^[2-5]。在中国,草地早熟禾被广泛应用于城市绿化及高尔夫球场球道中,而匍匐翦股颖则是高尔夫球场果岭的常用草种,目前在这两个草种上均已发现夏季斑枯病菌为害^[6-7]。化学药剂仍是防治夏季斑枯病最有效的方式,其中甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂(QoIs)嘧菌酯的防效较好^[8],在该病害防治上已使用多年,但目前尚未见有关夏季斑枯病菌群体对嘧菌酯敏感性的研究报道。

QoIs 主要作用于电子传递链的复合物 III,阻止电子传递,抑制能量合成。一些植物病原菌可通过旁路氧化呼吸(AOX)途径抵抗 QoIs 的抑制^[9],而病原菌的 AOX 途径可被水杨脞酸(SHAM)

等抑制^[10],因此,SHAM 常被用于植物病原菌对 QoIs 的敏感性测定中,以消除 AOX 途径对敏感性测定的影响^[11]。但也有研究显示,添加或不添加 SHAM,一些植物病原菌对 QoIs 的敏感性并无明显变化^[11-12];在添加 SHAM 后,QoIs 对有些植物病原菌的 EC_{50} 值甚至较不添加时反而有所升高^[10, 13-14];表明不同植物病原菌在受到 QoIs 选择压力时启动 AOX 途径的水平存在差异^[10]。而有关夏季斑枯病菌在 QoIs 药剂选择压力下利用 AOX 途径的能力尚不明确。

嘧菌酯是由先正达公司开发的第一个 QoIs 杀菌剂,对植物病原菌孢子及菌丝阶段均具有良好的抑制活性^[9],但病原菌极易对其产生抗性,属于高抗药性风险杀菌剂^[15]。已有研究表明,病原菌对 QoIs 抗性的产生主要与其细胞色素 *b* 基因(*Cytb*)上的点突变相关,目前发现主要有 3 种点突变可引起对 QoIs 的抗性:143 位密码子由甘氨酸突变为丙氨酸(G143A),129 位密码子由苯丙氨酸突变为亮氨酸(F129L),以及 137 位密码子由甘氨酸突变为精氨酸(G137R)。其中 G143A 突变最为常见,在多种病原菌中均可导致高抗性,而

F129L 和 G137R 突变则较少, 且主要导致低水平抗性^[11, 16]。然而, 也有研究显示, 一些对 QoIs 敏感性下降的植物病原菌在 *Cytb* 基因上并未发生任何突变, 其抗性机制尚不明确^[14, 17-18]。

基于以上背景, 本研究测定了 SHAM 对夏季斑枯病菌菌丝生长的影响, 以及添加 SHAM 对病原菌对嘧菌酯敏感性的影响, 以评估旁路氧化呼吸途径在夏季斑枯病菌对嘧菌酯敏感性测定中的作用; 在此基础上, 测定了北京地区不同地理及寄主来源夏季斑枯病菌对嘧菌酯的敏感性, 建立了相对敏感性基线, 以监测该病原菌对嘧菌酯的敏感性变化; 比对分析并克隆了夏季斑枯病菌 *Cytb* 基因部分序列, 探寻是否存在与抗药性相关的点突变。以为夏季斑枯病的有效防治及抗药性治理提供依据, 同时为 QoIs 抗性机制的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

2015—2016 连续两年于北京地区 8 个地块采集具有典型夏季斑枯病症状的草地早熟禾和匍匐翦股颖病样, 其中 7 个采集地为高尔夫球场球道或果岭 (分别用符号 BX、TX、APEC、JH、JSH、QHW 和 TA 表示), 均有 QoIs 施用历史, 1 个采集地为城市绿化草坪 (用 CAU 表示), 无 QoIs 施用历史, 该采样点的夏季斑枯病菌群体被认为是对 QoIs 敏感的群体。室内条件下采用 Bassoriello 等^[2]报道的方法进行病原菌的分离, 获得具有一致

菌落形态的真菌分离物, 经形态鉴定确定其为夏季斑枯病菌 *M. poae*^[19]。切取菌丝块转至灭菌的 2 mL 冻存管, 加入 1.5 mL 灭菌的 20% 甘油, 使菌丝块完全浸入甘油中, 菌株置于 10 ℃ 培养箱中进行长期保存。供试菌株信息见表 1。

1.2 供试药剂

98% 的嘧菌酯 (azoxystrobin) 原药, 由江苏省农业科学院植物保护研究所刘永锋实验室提供, 用甲醇溶解, 配成 1×10^4 $\mu\text{g/mL}$ 的母液; 99% 的水杨脞酸 (SHAM), 购自美国 Sigma-Aldrich 公司, 用甲醇溶解, 配成 1×10^5 $\mu\text{g/mL}$ 的母液。所有母液于 4 ℃ 保存, 备用。TSINGKE master mix, 擎科生物有限公司 (南京)。

1.3 水杨脞酸对菌丝生长的影响

随机选取 9 株夏季斑枯病菌, 采用菌丝生长速率法^[20]测定 SHAM 对菌丝生长的影响。用甲醇将 SHAM 母液稀释成系列浓度并制成含药 PDA 平板, 使 SHAM 最终质量浓度分别为 1、10、20、40、60、80 和 100 $\mu\text{g/mL}$, 以加入等体积甲醇 (0.1%) 的平板为对照。供试菌株在 PDA 培养基上生长 7 d 后, 沿菌落边缘打取直径 5 mm 的菌饼并转接至含药平板中心, 置于 25 ℃、黑暗条件下培养 5 d, 测量菌落直径。每处理重复 3 次。按公式 (1) 求出不同浓度 SHAM 对菌丝生长的抑制率 (%)。

菌丝生长抑制率/% =

$$\frac{\text{对照菌落直径} - \text{处理菌落直径}}{\text{对照菌落直径} - \text{菌饼直径}} \times 100 \quad (1)$$

表 1 北京地区草坪草夏季斑枯病菌菌株信息					
Table 1 The information of <i>M. poae</i> isolates from turfgrass in Beijing					
采样点 Sampling site	简写 Abbreviation	菌株数 No. of isolates	采样时间 Year of collection	寄主 Host species	QoIs 杀菌剂施用 Exposed to QoIs
宝兴高尔夫俱乐部 Baoxing golf course	BX	11	2016	草地早熟禾 <i>P. pratensis</i>	是 Yes
天星高尔夫俱乐部 Tianxing golf course	TX	11	2016	草地早熟禾 <i>P. pratensis</i>	是 Yes
APEC 会都高尔夫俱乐部 APEC Huidu golf course	APEC	10	2016	草地早熟禾 <i>P. pratensis</i>	是 Yes
京辉高尔夫俱乐部 Jinghui golf course	JH	39	2016	草地早熟禾 <i>P. pratensis</i> 匍匐翦股颖 <i>A. palustris</i>	是 Yes
净山湖高尔夫俱乐部 Jingshanhu golf course	JSH	4	2015	草地早熟禾 <i>P. pratensis</i>	是 Yes
清河湾高尔夫俱乐部 Qinghe Bay golf course	QHW	21	2016	匍匐翦股颖 <i>A. palustris</i>	是 Yes
天安高尔夫俱乐部 Tian'an Holiday golf course	TA	9	2016	匍匐翦股颖 <i>A. palustris</i>	是 Yes
中国农业大学 China Agricultural University	CAU	9	2016	草地早熟禾 <i>P. pratensis</i>	否 No

1.4 水杨肟酸在菌株对噬菌酯敏感性测定中的作用

随机选取 12 株夏季斑枯病菌，以 1.3 节试验确定的对病原菌菌丝生长影响较小 (抑制率 < 20%) 的 SHAM 浓度进行处理，确定 SHAM 在菌株对噬菌酯敏感性测定中的影响。用甲醇将噬菌酯母液稀释成系列浓度，制成噬菌酯终浓度分别为 0.000 1、0.001、0.01、0.1、1 及 10 $\mu\text{g/mL}$ 的含药平板；用甲醇将 SHAM 母液稀释后与上述系列浓度噬菌酯一起添加至 PDA 培养基中，制得同时含 SHAM 及相同系列终浓度噬菌酯的含药平板。分别以仅添加等体积甲醇和 SHAM 的 PDA 培养基为对照，每处理重复 3 次。同 1.3 节采用菌丝生长速率法测定各处理菌落直径，计算药剂对菌丝生长的抑制率。

1.5 菌株对噬菌酯的敏感性测定

参照 1.4 节方法，测定噬菌酯对所有供试 114 株夏季斑枯病菌的 EC_{50} 值。

1.6 夏季斑枯病菌 *Cytb* 部分序列分析

选取对噬菌酯敏感性存在差异的 12 株夏季斑枯病菌，用于探寻病原菌对噬菌酯抗性的分子机制。采用同属稻瘟病菌 *M. grisea* 的 *Cytb* 部分序列 (KP877608.1) 在夏季斑枯病菌线粒体基因组 (*M. poae* ATCC 64411 mitochondrial supercontigs) 数据库中进行 BLAST 同源性搜索^[21]，得到夏季斑枯病菌 *Cytb* 部分核苷酸序列，其包含了编码与对噬菌酯抗性产生相关的 129、137 及 143 位氨基酸^[11]的碱基序列。利用 Primer 3 设计引物 (MpCytb_F: AAATCGGCACAGACTCAATCG, MpCytb_R: GGCTACAAAACCTCAGAAAAC) 扩增与对噬菌酯抗性相关区域。PCR 反应总体体系为 30 μL ，包含 $1 \times \text{TSINGKE}$ master mix，200 nmol/L 前引物和后引物，以及 50~100 ng 的基因组 DNA。PCR 反应程序为：94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min；94 $^{\circ}\text{C}$ 15 s，62 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min，30 个循环；最后于 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测，将割胶纯化回收后的 PCR 产物送至上海生工生物有限公司进行测序。通过 BioEdit 软件进行序列比对分析。

1.7 数据统计分析

以菌丝生长抑制率几率值为纵坐标 (y)，添加和不添加 SHAM 条件下噬菌酯系列浓度的对数为横坐标 (x)，得到毒力回归方程 $y = bx + a$ 及相关系数 (r)，计算 EC_{50} 值。采用 DPS 7.05 软件比较不同 SHAM 添加浓度对夏季斑枯病菌菌丝生长抑

制率的差异显著性 ($\alpha = 0.05$)，比较添加和不添加 SHAM 时 EC_{50} 值在 $\alpha = 0.05$ 水平的差异显著性。通过 DPS 7.05 软件分析供试 114 株夏季斑枯病菌对噬菌酯的敏感性频率分布，绘制敏感性频率分布图，并进行 Shapiro-Wilk 正态性检验，同时采用最小显著性差异法 (LSD) 比较不同地理及寄主来源夏季斑枯病菌对噬菌酯敏感性的差异显著性 ($\alpha = 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 水杨肟酸对菌丝生长及其对噬菌酯敏感性的影响

结果 (表 2) 显示：SHAM 对夏季斑枯病菌菌丝生长具有明显的抑制作用，且不同浓度下抑制率差异显著 ($F=20.812$, $P<0.000\ 1$)。其中，当 SHAM 质量浓度为 1、10 和 20 $\mu\text{g/mL}$ 时，其对菌丝生长的影响与对照相比并无显著差异；当 SHAM 质量浓度为 40 $\mu\text{g/mL}$ 时，抑制率在 6.08%~14.42% 之间；当 SHAM 超过 40 $\mu\text{g/mL}$ 时，对部分菌株的抑制率超过 20%，且随其浓度升高抑制率可进一步升到 36.90%。根据已有研究中通常以对病原菌菌丝生长有一定抑制作用但抑制率小于 30% 的 SHAM 浓度作为适宜的添加浓度^[22]，本研究确定了后续试验中 SHAM 的添加水平为 40 $\mu\text{g/mL}$ 。结果 (表 3) 表明：添加和不添加 SHAM 条件下，噬

表 2 不同浓度水杨肟酸对 9 株夏季斑枯病菌菌丝生长的抑制作用

Table 2 Mycelial growth inhibition of 9 isolates of <i>M. poae</i> with salicylhydroxamic acid (SHAM) at different concentrations		
水杨肟酸质量浓度 Conc. of SHAM/ ($\mu\text{g/mL}$)	抑制率 ¹ Mycelial growth inhibition/%	
	范围 Range	均值 Mean $\pm$ SD
100	11.25~36.90	23.62 $\pm$ 9.22 a
80	7.50~34.52	21.97 $\pm$ 9.95 a
60	0.00~23.81	14.14 $\pm$ 7.94 b
40	6.08~14.42	9.72 $\pm$ 2.72 bc
20	2.43~7.19	4.43 $\pm$ 1.79 cd
10	-0.04~2.51	1.34 $\pm$ 1.13 d
1	0.00~3.70	1.08 $\pm$ 1.29 d
0	0	0 d

¹表中抑制率均值后不同小写字母表示经最小显著性差异法检验在 $P\leq 0.05$ 水平差异显著。
¹The different lowercase letters in the same column after mean EC_{50} values indicate significant difference according to t test (least significant difference [LSD], $P\leq 0.05$).

表 3 添加及不添加水杨脲酸条件下夏季斑枯病菌对啞菌酯的敏感性

Table 3 Sensitivity of *M. poae* isolates to azoxystrobin with or without salicylhydroxamic acid (SHAM)

菌株编号 Isolate number	EC ₅₀ 值 ¹ EC ₅₀ value/(μg/mL)	
	不添加水杨脲酸 Without SHAM	添加水杨脲酸 With SHAM
LT122	0.009 6 a	0.003 3 b
MP16	0.033 7 a	0.037 6 a
MP107	0.013 3 a	0.031 8 a
MP1	0.009 3 a	0.006 6 a
MP10	0.032 1 a	0.023 6 a
MP131	0.044 1 a	0.024 8 a
MP50	0.116 4 a	0.164 1 a
LT108	0.011 4 a	0.015 3 a
LT145	0.010 0 a	0.009 7 a
LT223	0.002 2 a	0.005 7 a
LT174	0.007 5 a	0.004 1 a
LT98	0.039 2 a	0.040 0 a
平均值 Mean	0.027 4 a	0.030 5 a

¹表中平均 EC₅₀ 值后不同小写字母表示经最小显著性差异法检验在 $P\leq 0.05$ 水平差异显著。

¹The different lowercase letters in the same column after mean EC₅₀ values indicate significant difference according to *t* test (least significant difference [LSD], $P\leq 0.05$).

菌酯对 12 株夏季斑枯病菌的 EC₅₀ 值仅 1 株 (LT122) 存在显著差异, 其余均无显著差异; 啞菌酯对 12 株夏季斑枯病菌的平均 EC₅₀ 值也无显著差异 ($F = 0.041\ 0$, $P = 0.842\ 3$)。

2.2 夏季斑枯病菌对啞菌酯的敏感性

啞菌酯对 114 株夏季斑枯病菌的 EC₅₀ 值范围为 0.001 0~0.146 5 μg/mL, 平均 EC₅₀ 值为 (0.017 4 ± 0.026 1) μg/mL, EC₅₀ 最大值和最小值相差 146.5 倍。Shapiro-Wilk 正态性检验结果显示, 夏季斑枯病菌对啞菌酯的敏感性频率不符合正态分布 ($W = 0.499\ 7$, $P < 0.05$) (图 1)。

分析不同地理来源夏季斑枯病菌对啞菌酯的敏感性, 结果 (表 4) 显示: 无 QoIs 施用历史地区采集的病原菌敏感群体 (CAU) 的平均 EC₅₀ 值为 (0.011 8 ± 0.009 3) μg/mL; 有 QoIs 施用历史地区病原菌夏季斑枯病菌群体的平均 EC₅₀ 值为 (0.017 9 ± 0.027 0) μg/mL, 其中, 最大值为 (0.043 8 ± 0.068 6) μg/mL, 来自北京净山湖高尔夫球场 (JSH), 最小值为 (0.010 3 ± 0.007 1) μg/mL, 来自北京天安假日高尔夫球场 (TA)。LSD 检验结果显示, 来自 APEC 会都高尔夫俱乐部和净山湖高尔夫球

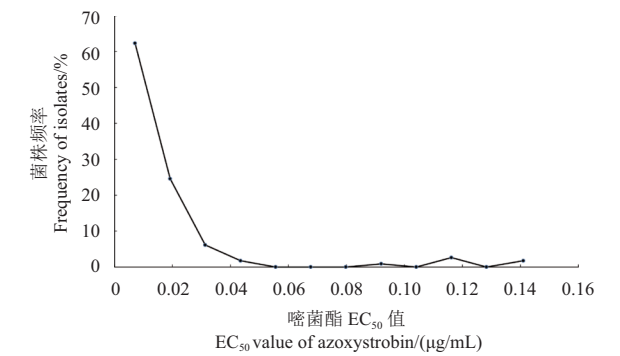


图 1 供试 114 株夏季斑枯病菌对啞菌酯的敏感性频率分布

Fig. 1 Frequency distribution of the sensitivity of 114 *M. poae* isolates to azoxystrobin

表 4 不同寄主来源夏季斑枯病菌对啞菌酯的敏感性

Table 4 Sensitivity of *M. poae* isolates from different turfgrass species to azoxystrobin

采样点 Sampling site	菌株数 No. of isolates	EC ₅₀ 值 ¹ EC ₅₀ value/(μg/mL)	
		范围 Range	均值 Mean ± SD
BX	11	0.003 4~0.030 3	0.012 2 ± 0.008 1 bc
TX	11	0.004 1~0.120 6	0.011 2 ± 0.004 4 c
APEC	10	0.001 8~0.798 7	0.036 2 ± 0.043 4 ab
JH	39	0.001 0~0.136 3	0.016 3 ± 0.024 8 bc
JSH	4	0.005 9~0.146 5	0.043 8 ± 0.068 6 a
QHW	21	0.002 3~0.119 7	0.016 9 ± 0.025 1 bc
TA	9	0.001 1~0.024 0	0.010 3 ± 0.007 1 c
CAU	9	0.002 2~0.032 6	0.011 8 ± 0.009 3 c

¹表中平均 EC₅₀ 值后不同小写字母表示经最小显著性差异法检验在 $P\leq 0.05$ 水平差异显著。

¹The different lowercase letters in the same column after mean EC₅₀ indicate significant difference according to *t* test (least significant difference [LSD], $P\leq 0.05$).

的夏季斑枯病菌的平均 EC₅₀ 值与敏感群体 (CAU) 相比存在显著差异 (表 4)。进一步分析不同寄主来源病原菌群体对啞菌酯的敏感性差异 (表 5), 发现啞菌酯对草地早熟禾和匍匐翦股颖上夏季斑枯病菌的平均 EC₅₀ 值亦无显著差异 ($F = 0.404\ 0$, $P = 0.526\ 5$)。

供试菌株对啞菌酯的敏感性虽然呈现一定程度的分化, 但仍有 70.18% 的菌株位于图 1 中相应的主峰范围, Shapiro-Wilk 正态性检验结果显示, 这部分菌株对啞菌酯的敏感性频率呈近似正态分布 ($W = 0.970\ 8$, $P = 0.064\ 0 > 0.05$), 其平均 EC₅₀ 值为 (0.007 8 ± 0.003 7) μg/mL, 因此可将此 EC₅₀ 平均值作为夏季斑枯病菌对啞菌酯的相对敏感性基线。

表 5 不同寄主来源夏季斑枯病菌对啞菌酯的敏感性

Table 5 Sensitivity of <i>M. poae</i> isolates from different turfgrass species to azoxystrobin			
寄主 Host	菌株数 No. of isolates	EC ₅₀ 值 ¹ EC ₅₀ value/(μg/mL)	
		范围 Range	均值 Mean ± SD
匍匐翦股颖 <i>A. palustris</i>	29	0.001 1~0.119 7	0.014 7 ± 0.021 8 a
草地早熟禾 <i>P. pratensis</i>	85	0.001 0~0.146 5	0.018 3 ± 0.027 5 a

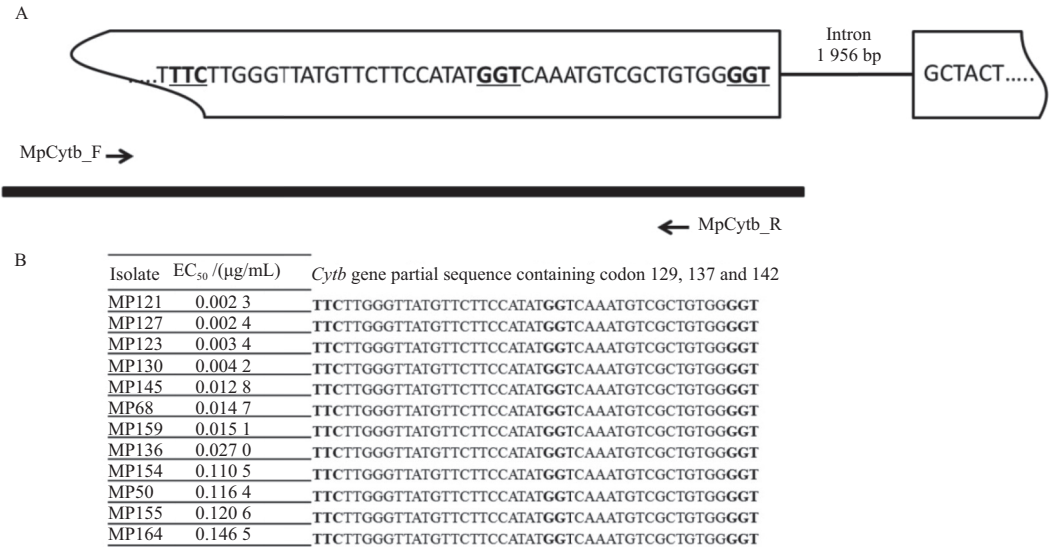
¹表中平均 EC₅₀ 值后不同小写字母表示经最小显著差异法检验在 $P \leq 0.05$ 水平差异显著。

¹The different lowercase letters in the same column after mean EC₅₀ values indicate significant difference according to *t* test (least significant difference [LSD], $P \leq 0.05$).

2.3 Cytb 序列分析

BLASTN 分析显示，夏季斑枯病菌线粒体基因组上有 4 个区域 (分别为 311、165、200 和

66 bp) 与稻瘟病菌 *Cytb* 参考序列的相似度达到了 82%~87% (E 值 $< 4 \times 10^{-13}$)，通过比对分析，从夏季斑枯病菌线粒体基因组中获得了该菌 *Cytb* 的部分序列 (8 639 bp)，该序列包含了编码与啞菌酯抗性相关的 3 个密码子 (F129、G137 和 G143) 碱基序列，进一步分析显示，其 143 位和 144 位密码子之间插入了一段长为 1 956 bp 的内含子 (图 2A)。根据内含子 5' 剪切位点上游外显子最后一个碱基为 T，以及内含子 3' 剪切位点为 G 的特点，认为该内含子为 I 型内含子^[23]。通过设计引物 MpCytb_F/MpCytb_R，用于扩增供试菌株中包含 3 个抗性位点及 143 和 144 位密码子间部分内含子的序列，比对结果显示，所有菌株均含有 I 型内含子，且在上述 3 个位点上碱基序列一致，未出现与抗性相关的点突变 (图 2B)。



注：A 为细胞色素 *b* 部分序列中外显子和内含子结构示意图，方框表示外显子，线型表示内含子，黑色粗线表示包含与 QoIs 抗性相关的 3 个密码子部分序列；B 为对啞菌酯敏感性存在差异的 12 株夏季斑枯病菌 *Cytb* 基因部分序列比对结果，129、127 和 143 位密码子在图中用粗体字标识。
Note: A, structure at the exon-intron junction in the partial *Cytb* fragment, boxes indicate exons and line indicates intron, bold black line illustrates the amplified region containing the three codons conferring QoIs resistance. B, alignment of the partial nucleotide sequences of the *Cytb* gene from 12 *M. poae* isolates, codon 129, 137 and 143 are in bold.

图 2 夏季斑枯病菌细胞色素 *b* 基因部分序列信息

Fig. 2 Partial characterization of the *M. poae* cytochrome *b* (*Cytb*)

3 结论与讨论

啞菌酯是 1996 年诞生的第一个 QoIs 产品，目前已广泛应用于多种农业植物病害的防治^[9]，且已在草坪病害防治中使用多年^[24-25]。本研究测定了北京地区 114 株不同地理和寄主来源草坪草夏季斑枯病菌对啞菌酯的敏感性，发现不同菌株间敏感性存在显著差异，EC₅₀ 最大值与最小值相差 146.5 倍，其中与无 QoIs 药剂施用历史地区的夏

季斑枯病菌群体 (CAU) 相比，部分有 QoIs 药剂施用历史地区的菌株群体 (APEC 和 JSH) 对啞菌酯的敏感性存在显著差异，表明北京地区夏季斑枯病菌群体已出现对啞菌酯敏感性下降的现象，因此应密切关注其田间抗性发展动态。本研究同时建立了夏季斑枯病菌对啞菌酯的相对敏感性基线，可为夏季斑枯病菌对啞菌酯的田间抗性监测提供参考。

SHAM 作为 AOX 途径的抑制剂, 常被用于 QoIs 的室内敏感性测定中^[11, 16], 但针对不同病原菌, SHAM 的添加浓度存在差别^[10-11, 22, 26]。本研究通过比较 SHAM 不同添加水平下对夏季斑枯病菌菌丝生长的影响, 发现随着 SHAM 浓度升高, 其对菌丝生长的抑制作用趋于明显, 其中, 当 SHAM 添加水平为 40 $\mu\text{g/mL}$ 时, 抑制作用较明显, 但抑制率未超过 20%, 该浓度可作为敏感性测定中适宜的 SHAM 添加浓度^[22]。SHAM 对菌丝生长的抑制作用在其他植物病原真菌上也有报道^[10, 22, 26]。本研究还比较了添加和不添加 40 $\mu\text{g/mL}$ SHAM 条件下, 夏季斑枯病菌对嘧菌酯的敏感性, 发现二者间并不存在显著差异。综上, 我们认为, 夏季斑枯病菌在受到嘧菌酯胁迫时, 不会启动 AOX 途径, 因此, 在进行夏季斑枯病菌对嘧菌酯的敏感性测定时, 可不用添加 SHAM。

已有研究表明, 病原菌 *Cytb* 基因上的点突变可引起对 QoIs 的抗性, 目前已报道 3 种相关的点突变, 其中 G143A 的突变可引起高抗性, 而 F127L 及 G137R 的突变可引起低或中等抗性^[23, 27]。本研究通过同源比对分析获得夏季斑枯病菌的部分 *Cytb* 序列, 结果显示, 该菌 *Cytb* 序列的 143 位密码子下游插入了一段 1 956 bp 的内含子, 这是首次发现夏季斑枯病菌 *Cytb* 基因在 143 位密码子下游有内含子插入。根据已有报道, 该内含子属于 I 型内含子^[23]。I 型内含子具有自我剪切功能, 而在外显子和内含子连接区发生的碱基突变可能会破坏其剪切过程, 造成 *Cytb* 转录及表达水平下降以及细胞色素 *bcl* 复合物产能的降低, 并最终影响病原菌的呼吸功能^[23]。因此, 在下游有内含子插入的情况下, G143A 位点的突变可能会降低病原菌的田间生存适合度, 使得该突变群体更容易被自然淘汰^[23, 28]。*Cytb* 基因 143 位密码子下游插入内含子的现象在其他病原菌中也有报道, 如锈菌属真菌 (*Puccinia* spp.)、链格孢属真菌 (*Alternaria* spp.)、灰霉病菌 *Botrytis cinerea*、山核桃疮痂病菌 *Fusicladium effusum*、褐霉病菌 *Monilinia fructicola* 以及柑橘黑斑病菌 *Guignardia citricarpa* 等^[10, 23, 29-34], 但目前并未见具有该内含子的病原菌发生 G143A 突变的报道, G143A 的突变仅发生在 *Cytb* 基因 143 位密码子下游无内含子插入的病原菌中^[28]。由此推测夏季斑枯病菌不易对 QoIs 产生高水平抗性。敏感性测定结果也显示, 田间尚未出现夏季斑枯病菌对 QoIs 产生高抗性的菌株。进一步选取对嘧菌酯敏感性不同的夏季斑

枯病菌, 设计引物、扩增并比对了包含上述 3 个位点以及部分内含子的核苷酸序列, 结果显示, 所有菌株均在 *Cytb* 143 位密码子下游插入了 I 型内含子, 且在 3 个位点均未发生突变, 进一步证明了上述推测。

有研究认为, 植物病原菌对 QoIs 抗性的产生除了 AOX 途径的启动、*Cytb* 基因上的点突变外, 可能还存在其他未知的机制^[14]。本研究显示, 夏季斑枯病菌对嘧菌酯的敏感性呈现下降, 但在嘧菌酯胁迫下该菌并未启动 AOX 途径, 且在分子水平上未发现与嘧菌酯抗性相关的点突变, 因此, 笔者推测夏季斑枯病菌对嘧菌酯敏感性的降低可能也涉及其他分子机制。类似结果在其他一些植物病原菌中已有报道, 如芸薹生链格孢 *A. brassicicola* 和桃褐腐病菌 *M. fructicola* 对嘧菌酯表现为敏感性下降, 但在其 *Cytb* 基因上与嘧菌酯抗性相关的 3 个位点均未检测到突变, 且抗性的产生与 AOX 途径无关^[17, 31]。进一步发现, 所有芸薹生链格孢和部分桃褐腐病菌菌株 *Cytb* 基因 143 位密码子下游同样也出现了内含子的插入^[17, 34]。研究者认为, 植物病原菌对 QoIs 的抗性, 除了由 *Cytb* 基因点突变引起的质量抗性外, 还存在其他未知机制引起的数量抗性, 且质量抗性可能会紧随数量抗性之后而发生^[17-18]。本研究中, 夏季斑枯病菌对嘧菌酯敏感性下降的准确机制还需进一步研究确定, 同时应密切关注夏季斑枯病菌对嘧菌酯的敏感性变化动态, 及时避免或延缓抗药性的发生、发展。

参考文献 (Reference):

[1] LANDSCHOOT P J, JACKSON N. *Magnaporthe poae* sp. nov., a hyphopodiate fungus with a *Phialophora* anamorph from grass roots in the United States[J]. Mycol Res, 1989, 93(1): 59-62.

[2] BASSORIELLO M M I, JORDAN K S. First report of *Magnaporthe poae*, cause of summer patch disease on annual bluegrass, in Canada[J]. Plant Dis, 2012, 96(11): 1698.

[3] SWIFT C E, BLESSINGER A, BRANDT N, et al. First report of summer patch of Kentucky bluegrass caused by *Magnaporthe poae* in Colorado[J]. Plant Dis, 2007, 91(11): 1519.

[4] TREDWAY L P. First report of summer patch of creeping bentgrass caused by *Magnaporthe poae* in North Carolina[J]. Plant Dis, 2005, 89(2): 204.

[5] BUNTING T E, PLUMLEY K A, CLARKE B, et al. Identification of *Magnaporthe poae* by PCR and examination of its relationship to other fungi by analysis of their nuclear rDNA ITS-1 regions[J]. Phytopathology, 1996, 86(4): 398-404.

- [6] LIU Q Y, LIU M H, LI T, et al. First report of summer patch of Kentucky bluegrass caused by *Magnaporthe poae* in China[J]. Plant Dis, 2017, 101(1): 250.
- [7] HU J, LIU Q Y, LIU M H, et al. First report of summer patch of creeping bentgrass caused by *Magnaporthe poae* in China[J]. Plant Dis, 2017, 101(4): 634.
- [8] ZHAO S, CLARKE B B, SHEN Q, et al. Development and application of a TaqMan real-time PCR assay for rapid detection of *Magnaporthe poae*[J]. Mycologia, 2012, 104(5): 1250-1259.
- [9] BARTLETT D W, CLOUGH J M, GODWIN J R, et al. The strobilurin fungicides[J]. Pest Manag Sci, 2002, 58(7): 649-662.
- [10] SEYRAN M, BRENNEMAN T B, STEVENSON K L. *In vitro* toxicity of alternative oxidase inhibitors salicylhydroxamic acid and propyl gallate on *Fusicladium effusum*[J]. J Pes Sci, 2010, 83(4): 421-427.
- [11] HINCAPIE M, WANG N Y, PERES N A, et al. Baseline sensitivity of *Guignardia citricarpa* isolates from Florida to azoxystrobin and pyraclostrobin[J]. Plant Dis, 2014, 98(6): 780-789.
- [12] 吴娥娇, 沈国桢, 刘训达, 等. 水杨肟酸对致病疫霉生长及其对噬菌酯敏感性的影响[J]. 农药学报, 2015, 17(4): 384-390.
WU E J, SHEN G Z, LIU X D, et al. Effect of salicylhydroxamic acid (SHAM) on the mycelium growth and sensitivity of *Phytophthora infestans* to azoxystrobin[J]. Chin J Pestic Sci, 2015, 17(4): 384-390.
- [13] 皇甫延红, 戴德江, 时浩杰, 等. 浙江省果蔬灰霉病菌对噬菌酯的抗性研究[J]. 农药学报, 2013, 15(5): 504-510.
HUANGFU Y H, DAI D J, SHI H J, et al. Study on resistance of *Botrytis cinerea* to azoxystrobin collected from fruits and vegetables in Zhejiang Province[J]. Chin J Pestic Sci, 2013, 15(5): 504-510.
- [14] WALKER A S, AUCLAIR C, GREDET M, et al. First occurrence of resistance to strobilurin fungicides in *Microdochium nivale* and *Microdochium majus* from French naturally infected wheat grains[J]. Pest Manag Sci, 2009, 65(8): 906-915.
- [15] ISHII H, HOLLOMON D W. Fungicide resistance in plant pathogens: principles and a guide to practical management[M]. Tokyo: Springer, 2015: 3-12.
- [16] WISE K A, BRADLEY C A, PASCHE J S, et al. Baseline sensitivity of *Ascochyta rabiei* to azoxystrobin, pyraclostrobin, and boscalid[J]. Plant Dis, 2008, 92(2): 295-300.
- [17] PEREIRA W V, PRIMIANO I V, MORALES R G F, et al. Reduced sensitivity to azoxystrobin of *Monilinia fructicola* isolates from Brazilian stone fruits is not associated with previously described mutations in the cytochrome *b* gene[J]. Plant Dis, 2017, 101(5): 766-773.
- [18] KÖLLER W, PARKER D M, TURECHEK W W, et al. A two-phase resistance response of *Venturia inaequalis* populations to the QoI fungicides kresoxim-methyl and trifloxystrobin[J]. Plant Dis, 2004, 88(5): 537-544.
- [19] CLARKE B B, GOULD A B. Turfgrass patch diseases caused by ectotrophic root-infecting fungi[M]. St. Paul, MN: The American Phytopathological Society Press, 1993.
- [20] 李波涛, 吴隆起, 倪笑霞, 等. 水稻稻瘟病菌对烯肟菌胺的抗性风险评估及抗性机制初探[J]. 植物病理学报, 2014, 44(1): 80-87.
LI B T, WU L Q, NI X X, et al. Risk assessment and molecular mechanism of the resistance of *Magnaporthe oryzae* from rice to SYP-1620[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2014, 44(1): 80-87.
- [21] OKAGAKI L H, NUNES C C, SAILSBERRY J, et al. Genome sequences of three phytopathogenic species of the Magnaporthaceae family of fungi[J]. G3: Genes Genom Genet, 2015, 5(12): 2539-2545.
- [22] REBOLLAR-ALVITER A, MADDEN L V, JEFFERS S N, et al. Baseline and differential sensitivity to two QoI fungicides among isolates of *Phytophthora cactorum* that cause leather rot and crown rot on strawberry[J]. Plant Dis, 2007, 91(12): 1625-1637.
- [23] STANDISH J R, AVENOT H F, BRENNEMAN T B, et al. Location of an intron in the cytochrome *b* gene indicates reduced risk of QoI fungicide resistance in *Fusicladium effusum*[J]. Plant Dis, 2016, 100(11): 2294-2298.
- [24] YOUNG J R, TOMASO-PETERSON M, TREDWAY L P, et al. Occurrence and molecular identification of azoxystrobin-resistant *Colletotrichum cereale* isolates from golf course putting greens in the Southern United States[J]. Plant Dis, 2010, 94(6): 751-757.
- [25] UDDIN W, VIJI G, VINCELLI P. Gray leaf spot (blast) of perennial ryegrass turf: an emerging problem for the turfgrass industry[J]. Plant Dis, 2003, 87(8): 880-889.
- [26] LIANG H J, DI Y L, LI J L, et al. Baseline sensitivity of pyraclostrobin and toxicity of SHAM to *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. Plant Dis, 2015, 99(2): 267-273.
- [27] CASTROAGUDÍN V L, CERESINI P C, DE OLIVEIRA S C, et al. Resistance to QoI fungicides is widespread in Brazilian populations of the wheat blast pathogen *Magnaporthe oryzae*[J]. Phytopathology, 2015, 105(3): 284-294.
- [28] VALLIÈRES C, TROUILLARD M, DUJARDIN G, et al. Deleterious effect of the Qo inhibitor compound resistance-conferring mutation G143A in the intron-containing cytochrome *b* gene and mechanisms for bypassing it[J]. Appl Environ Microbiol, 2011, 77(6): 2088-2093.
- [29] BANNO S, YAMASHITA K, FUKUMORI F, et al. Characterization of QoI resistance in *Botrytis cinerea* and identification of two types of mitochondrial cytochrome *b* gene[J]. Plant Pathol, 2009, 58(1): 120-129.
- [30] GRASSO V, PALERMO S, SIEROTZKI H, et al. Cytochrome *b* gene structure and consequences for resistance to Qo inhibitor fungicides in plant pathogens[J]. Pest Manag Sci, 2006, 62(6): 465-472.
- [31] LUO C X, HU M J, JIN X, et al. An intron in the cytochrome *b* gene of *Monilinia fructicola* mitigates the risk of resistance development to QoI fungicides[J]. Pest Manag Sci, 2010, 66(12): 1308-1315.
- [32] MIESSNER S, MANN W, STAMMLER G. *Guignardia bidwellii*, the causal agent of black rot on grapevine has a low risk for QoI resistance[J]. J Plant Dis Protect, 2011, 118(2): 51-53.
- [33] SIEROTZKI H, FREY R, WULLSCHLEGER J, et al. Cytochrome *b* gene sequence and structure of *Pyrenophora teres* and *P. tritici-repentis* and implications for QoI resistance[J]. Pest Manag Sci, 2007, 63(3): 225-233.
- [34] KREIS R A, DILLARD H R, SMART C D. Population diversity and sensitivity to azoxystrobin of *Alternaria brassicicola* in New York State[J]. Plant Dis, 2016, 100(12): 2422-2426.

(责任编辑: 唐 静)