

上海地区草莓灰霉病菌对啮酰菌胺的敏感性 检测及抗性机制分析

刘欣¹, 吴雁¹, 成玮², 曾蓉¹, 徐丽慧¹, 高士刚¹, 戴富明^{*1}

(1. 上海市农业科学院 生态环境保护研究所, 上海 201403; 2. 上海市农业技术推广服务中心, 上海 201103)

摘要: 为明确上海地区草莓灰霉病菌 *Botrytis cinerea* Pers. 对主要防治药剂啮酰菌胺的敏感性水平及抗性机制, 采用平皿法检测了来自上海市 6 个区县的 195 株草莓灰霉病菌株对啮酰菌胺的敏感性, 并分析了其中 20 株不同敏感型菌株的琥珀酸脱氢酶基因序列。结果显示: 啮酰菌胺对上海地区草莓灰霉病菌菌丝生长的 EC_{50} 最小值为 $0.15 \mu\text{g/mL}$, 最大值大于 $110 \mu\text{g/mL}$; 对孢子萌发的 EC_{50} 最小值为 $0.19 \mu\text{g/mL}$, 最大值大于 $50 \mu\text{g/mL}$ 。上海地区草莓灰霉病菌对啮酰菌胺的抗性频率为 29.74% (抗性水平大于 10), 高抗频率为 20.51% (抗性水平大于 100)。该抗性的产生与琥珀酸脱氢酶 SdhB 亚基发生 H272R 或 P225F 突变有关, 其中 H272R 突变发生较为普遍。研究表明, 上海地区草莓灰霉病菌对啮酰菌胺的抗性水平及抗性频率较高, 主要抗性机制为病原菌琥珀酸脱氢酶 SdhB 亚基上的 H272R 突变。

关键词: 草莓; 灰霉病; 啮酰菌胺; 敏感性; 抗性机制; 灰葡萄孢; 琥珀酸脱氢酶

中图分类号: S482.2; S481.4 文献标志码: A 文章编号: 1008-7303(2018)04-0452-07

Sensitivity and resistance mechanism to boscalid of *Botrytis cinerea* from strawberry in Shanghai

LIU Xin¹, WU Yan¹, CHENG Wei², ZENG Rong¹, XU Lihui¹, GAO Shigang¹, DAI Fuming^{*1}

(1. Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China;

2. Shanghai Agriculture Technology Extension & Service Center, Shanghai 201103, China)

Abstract: In order to evaluate the sensitivity and the resistant mechanism of *Botrytis cinerea* Pers. (the causal agent of gray mold disease) from strawberry to boscalid, the sensitivity of 195 isolates in 6 districts in Shanghai were tested with petri plate. And the succinate dehydrogenase subunits genes of 20 isolates with different sensitivity were sequenced. The results showed that the lowest EC_{50} value of mycelial growth inhibition was $0.15 \mu\text{g/mL}$, and the highest value was over $110 \mu\text{g/mL}$. The lowest EC_{50} value of conidial germination was $0.19 \mu\text{g/mL}$, while the highest value was over $50 \mu\text{g/mL}$. In Shanghai, the resistance frequency was 29.74% (resistance factor >10), and the frequency of high resistance was 20.51% (resistance factor >100). Resistance mechanism analysis indicated that the resistance to boscalid could be attributed to point mutations at codon 272 or 225, which would lead to

收稿日期: 2018-04-08; 录用日期: 2018-07-11.

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

作者简介: 刘欣, 女, 实习研究员, 主要从事植物病理学研究, E-mail: liuxinyesno@163.com; *戴富明, 通信作者 (Author for correspondence), 男, 研究员, 主要从事植物病原菌致病机理与病害绿色防控技术研究, E-mail: fumingdai@163.com

the substitution of histidine to arginine (H272R), or proline to phenylalanine (P225F) in SdhB subunit of succinate dehydrogenase. And the H272R substitution was more common. This study showed the high resistance level and frequency to boscalid of *B. cinerea* from strawberry in Shanghai, and revealed that the H272R substitution in SdhB could be the main cause of the resistance.

Keywords: strawberry; gray mold; boscalid; sensitivity; resistance mechanism; *Botrytis cinerea*; succinate dehydrogenase

由灰葡萄孢 *Botrytis cinerea* Pers. 导致的灰霉病 (gray mold disease) 是草莓生产和储藏过程最重要的病害之一^[1], 草莓极易感染该病, 严重时可导致全果腐烂, 造成大规模减产^[2-3]。化学防治是目前防治草莓灰霉病最常见的措施之一^[4]。

啮酰菌胺属烟酰胺类内吸性杀菌剂, 对多种植物病害高效, 且低毒^[5]。已有研究表明, 啮酰菌胺对 *B. cinerea* 抑制活性高, 对草莓灰霉病的田间防治效果可达 90% 以上^[6], 现已有 50 多个啮酰菌胺单剂产品被登记用于防治灰霉病^[7]。啮酰菌胺在上海市作为草莓灰霉病的推荐防治药剂, 近 10 年来已在各区县草莓种植地被广泛使用。由于 *B. cinerea* 繁殖速度快、孢子数量大且较易产生遗传变异, 属易对药剂产生抗性的一类植物病原真菌^[8]。同时, 啮酰菌胺作用位点单一, 病原菌基因组的单核苷酸突变就可能对其产生抗性, 已被国际杀菌剂抗性委员会 (FRAC) 认定为产生抗性风险较高的杀菌剂^[8-9], *B. cinerea*-啮酰菌胺也被 FRAC 认定为是具有高度抗性风险的病原菌-杀菌剂组合^[8]。美国、德国等国家均已出现田间 *B. cinerea* 对啮酰菌胺产生抗性的报道^[1, 10-11]。啮酰菌胺作用位点为琥珀酸脱氢酶 (SDH), 该酶为线粒体呼吸链电子传递体系的蛋白复合体 II, 具有 4 个亚基, 其中 SdhA 为黄素蛋白, SdhB 为 3 个铁硫蛋白簇, SdhC 和 SdhD 为膜结合蛋白^[12]。据报道, *B. cinerea* 对啮酰菌胺抗性的产生与 SdhB 亚基 225、230、272 位点及 SdhD 亚基 132 位点的氨基酸发生突变有关, 但各研究报道中的突变类型均有不同, 分别涉及 SdhB 上的 P225L/F/T、N230I 和 H272Y/R/L, 以及 SdhD 上的 H132R 等^[10-11, 13]。

目前有关上海地区草莓灰霉病菌对啮酰菌胺的敏感性现状及抗性突变机制等均尚不明确。为此, 本研究采用菌丝生长速率法和孢子萌发法, 分别测定了采自上海市 6 个草莓种植区 (县) 13 个基地的 195 株单孢 *B. cinerea* 菌株不同生长阶段对

啮酰菌胺的敏感性, 同时, 随机选取 20 株抗性水平不同的菌株, 检测并分析了病原菌与抗性发生相关的突变位点及其与抗性水平的关系, 以期为啮酰菌胺在草莓灰霉防治中的合理使用, 以及其抗性监测及治理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

于 2017 年 2—4 月, 从上海市崇明县、奉贤区、嘉定区、金山区、浦东新区及青浦区的共计 13 个草莓生产基地, 采集具典型症状的灰霉病病果, 通过孢子液稀释分离法^[1]分离获得单孢菌株。将单孢菌株接种于 PDA 培养基上, 24 °C 下培养, 通过形态学特征^[3]鉴定, 保留与 *B. cinerea* 形态相符的菌株。来源于同一病果的病原菌保留 1 株, 每个采样点保留 15 株, 共获得 195 株单孢菌株。将单孢菌株转接至 PDA 试管斜面, 24 °C 培养 2 d 后, 于 4 °C 保存, 待用。

1.2 药剂、试剂及培养基

98% 啮酰菌胺 (boscalid) 原药购自上海悦联化工有限公司; 分析纯丙酮购自国药集团化学试剂有限公司。马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA) 购自美国 BD 公司, 用于菌株培养及菌丝生长抑制试验; 水琼脂培养基 (WA): 琼脂 15 g、无菌水 1 000 mL, 用于病原菌孢子萌发抑制试验。PCR SuperMix Easy Taq 酶、pEASY-T1 载体及大肠杆菌感受态 (*Trans*-T1), 购自北京全式金生物技术有限公司, 用于目的基因克隆。

1.3 菌丝生长抑制试验

采用菌丝生长速率法^[14]测定。将啮酰菌胺原药溶于丙酮, 配成 50 mg/mL 的母液。根据预试验结果, 再用丙酮将母液梯度稀释, 配成药剂最终质量浓度分别为 0.1、0.2、0.5、1、2 及 5 µg/mL 的含药 PDA 平板, 用于敏感菌株测定; 配制 2、5、20、50 及 110 µg/mL 的含药 PDA 平板, 用于

抗性菌株测定 (因浓度过高药剂易从培养基中析出, 因此最高质量浓度设为 110 $\mu\text{g/mL}$)。除 110 $\mu\text{g/mL}$ 培养基平板中丙酮的添加量为体积分数 0.22% 外, 其余处理丙酮的添加量均为 0.1%, 因此分别以添加 0.22% 和 0.1% 丙酮的 PDA 平板作为空白对照。在 24 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 5 d 的菌落边缘打取直径 5 mm 的菌饼, 接种到上述系列浓度的含药平板中央, 24 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗倒置培养 3 d 后, 用十字交叉法测量菌落直径, 每个菌株、每个浓度重复 3 次。以 Zhang 等^[15]报道的 2004—2006 年中国浙江及江苏省黄瓜、番茄等温室蔬菜上从未接触过啶酰菌胺的 *B. cinerea* 群体的敏感性基线 ($1.07 \pm 0.11 \mu\text{g/mL}$) 作为参照标准, 计算抗性水平 (R): 抗性水平 = 菌株 $\text{EC}_{50}/1.07 \mu\text{g/mL}$ 。抗性分级标准^[16]: $R < 10$ 为敏感 (S); $10 \leq R < 50$ 为低抗 (LR); $50 \leq R < 100$ 为中抗 (MR); $R \geq 100$ 为高抗 (HR)。

1.4 孢子萌发抑制试验

采用孢子萌发法^[17], 按病原菌菌丝生长抑制试验中所得抗性分级比例, 随机选取 40 株敏感菌株 (S)、3 株低抗菌株 (LR)、3 株中抗菌株 (MR) 及 12 株高抗菌株 (HR) 进行测定。将啶酰菌胺母液用丙酮稀释后配成药剂最终质量浓度分别为 0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、5 及 50 $\mu\text{g/mL}$ 的含药 WA 平板 (为避免药剂在培养基中析出而影响对孢子萌发的观察, 最高质量浓度设为 50 $\mu\text{g/mL}$), 空白对照加等量丙酮。从培养皿上刮取新鲜的分生孢子于无菌水中, 调节浓度至每 1 mL 约 10^6 个。取 100 μL 孢子悬浮液均匀涂布于含药 WA 平板上, 24 $^{\circ}\text{C}$ 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视为萌发。每菌株每个浓度重复 3 次, 每个重复观察孢子总数不低于 200 个。

1.5 琥珀酸脱氢酶基因序列测定及比对

从敏感性不同 (S 、 LR 、 MR 和 HR) 的菌株中各随机选择 5 株, 对其琥珀酸脱氢酶 (SDH) 的 4 条亚基编码基因 *SdhA*、*SdhB*、*SdhC* 与 *SdhD* 序列进行测定。菌丝预处理及总 DNA 提取参考 Harju 等^[18]报道的方法。*SdhA*、*SdhB*、*SdhC* 与 *SdhD* 基因扩增引物分别为: *SdhA*-F: ATGTCTTCATTTGCTATGCG, *SdhA*-R: CTATCCATTTTCATCTTTA; *SdhB*-F: TCGAACCTACTCGCCCTATCCAATT, *SdhB*-R: GACTTCTTAGAAAGCCATTTCTTTC;

SdhC-F: ATGTTTTTCACAGAGAGCAA, *SdhC*-R: CTACAAGAAAGCAACCAACG; *SdhD*-F: ATGGCTTCATTCATCAAACCATCCG, *SdhD*-R: TTATGCGCGCCAAATTCTTTTGATA。由生物工程 (上海) 公司对扩增产物进行测序。采用 NCBI 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 的 BLAST n 工具对敏感及抗性菌株的 SDH 亚基序列进行比对, 并以 NCBI 数据库中相关序列作为参考。参考序列 GenBank 序号分别为: KR705916.1 (*BcSdhA*)、KR866382.1 (*BcSdhB*)、KR705923.1 (*BcSdhC*) 和 KR705930.1 (*BcSdhD*)。

1.6 数据处理

应用 SPSS 19.0 统计软件对试验数据进行分析, 采用该软件描述统计模块进行 Shapiro-Wilk 法 (W 法) 正态性检验; 通过 probit 模块计算药剂抑制病原菌菌丝生长及孢子萌发的 EC_{50} 值; 根据抗性分级标准, 将抑制病原菌孢子萌发及菌丝生长的 EC_{50} 值转化为有序分类变量; 将 *SdhB* 基因突变与否及突变类型分别转化为分类变量, 用 Kendall's tau-b 法, 分别对病原菌孢子萌发与菌丝生长对药剂的敏感性、病原菌敏感性与突变的发生以及病原菌敏感性与突变类型的相关性进行分析。用 Office Excel 软件绘制频率分布直方图及正态分布曲线。

2 结果与分析

2.1 灰霉病菌菌丝生长与孢子萌发对啶酰菌胺的敏感性

菌丝生长抑制试验表明: 上海地区草莓灰霉病菌对啶酰菌胺的敏感性差异较大, 195 株菌株中, 抑制菌丝生长的 EC_{50} 最小值为 0.15 $\mu\text{g/mL}$, 最大值大于 110 $\mu\text{g/mL}$ 。经 W 法正态性检验, 195 株菌株菌丝生长的 EC_{50} 值频次分布 $W=0.60$, $P < 0.001$, 呈非连续性分布 (图 1), 表明病原菌自然群体对啶酰菌胺的敏感性存在一定分化, 部分菌株已产生抗药性。其中, 58 株菌株的 EC_{50} 值 $\geq 16.58 \mu\text{g/mL}$, 呈非连续性分布 (图 1); 其余 137 株菌株的 EC_{50} 值介于 0.15~2.45 $\mu\text{g/mL}$ 之间, 呈连续性正态分布, 其 $W=0.96$, $P = 0.15 > 0.05$ (图 2)。

分生孢子萌发抑制试验表明: 啶酰菌胺对 40 株敏感菌株孢子萌发的 EC_{50} 值为 0.19~1.21 $\mu\text{g/mL}$, 经 W 法正态性检验, 呈连续性正态

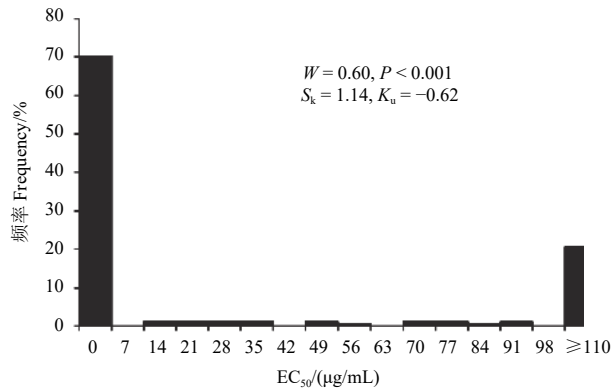


图1 供试 195 株菌株菌丝生长 EC₅₀ 值频率分布

Fig. 1 Frequency distribution of EC₅₀ values for the mycelial growth of 195 *B. cinerea* isolates

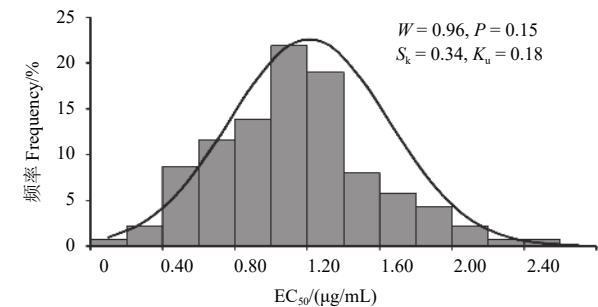


图2 啉酰菌胺对 137 株敏感菌株菌丝生长 EC₅₀ 值频率分布

Fig. 2 Frequency distribution of EC₅₀ values for the mycelial growth of 137 sensitive isolates of *B. cinerea*

分布, EC₅₀ 均值为 0.58 μg/mL(图 3), 而 18 株抗性菌株的 EC₅₀ 值均大于 50 μg/mL(表 1)。经非参数检验, 58 株菌株孢子萌发与菌丝生长阶段对啉酰菌胺的抗性表现呈强正相关性 (Kendall's tau-b = 0.948, $P < 0.001$)。

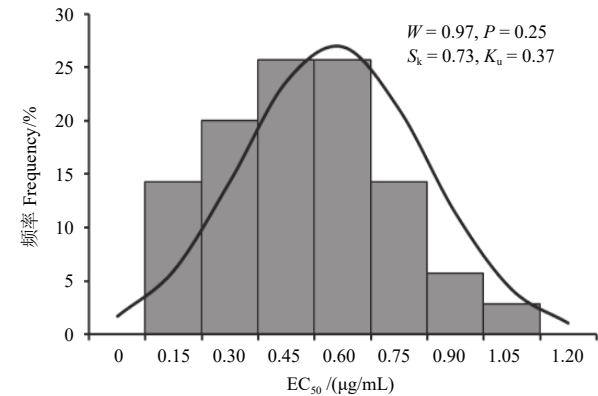


图3 啉酰菌胺对 40 株敏感菌株孢子萌发 EC₅₀ 值频率分布

Fig. 3 Frequency distribution of EC₅₀ values for the conidial germination of 40 sensitive isolates of *B. cinerea*

表 1 草莓灰霉病菌分生孢子萌发对啉酰菌胺的敏感性

Table 1 Sensitivity of the conidial germination of *B. cinerea* from strawberry to boscalid

病原菌菌丝生长抗性表型 Resistance phenotype (mycelial growth)	菌株数量/株 Number of strains/plant	EC ₅₀ /(μg/mL)	
		范围 Range	均值 ± 标准差 Mean ± SD
敏感 (S) Sensitive(S)	40	0.19~1.21	0.58 ± 0.25
低抗 (LR) Low resistance(LR)	3	>50	>50
中抗 (MR) Medium resistance(MR)	3	>50	>50
高抗 (HR) High resistance(HR)	12	>50	>50

2.2 2017 年上海地区草莓灰霉病菌对啉酰菌胺的抗性情况

菌丝生长抑制试验(表 2)表明: 2017 年从上海各区(县)草莓生产基地采集的灰霉病菌对啉酰菌胺的抗性水平较高, 其 EC₅₀ 最大值大于 110 μg/mL, 最高抗性水平大于 100, 且抗性频率较高, 总体抗性频率为 29.74%, 高抗频率为 20.51%。各区(县)中, 病原菌抗性频率较高的地区为浦东新区与嘉定区, 分别达 46.67% 和 40.00%; 来源于崇明县的病原菌抗性频率较低, 其 90% 的菌株均仍对啉酰菌胺敏感。

2.3 抗性突变位点

菌株 *SdhA*、*SdhB*、*SdhC* 与 *SdhD* 基因序列比对分析结果表明, 20 株不同敏感性菌株的 *SdhA*、*SdhC* 与 *SdhD* 3 个基因均未发生突变; 5 株敏感菌株的 *SdhB* 基因未发生突变而 15 株抗性菌株的 *SdhB* 亚基均发生了单氨基酸突变。经非参数检验, 突变的发生与抗性产生之间存在较显著的正相关性 (Kendall's tau-b = 0.60, $P = 0.02 < 0.05$)。

所检测的 15 株抗性菌株中, 有 13 株菌株的 *SdhB* 亚基 272 位组氨酸突变为精氨酸 (H272R, CAC 突变为 CGC), 2 株菌株的 225 位脯氨酸突变为苯丙氨酸 (P225F, CCC 突变为 TTC), 且突变类型与抗性水平之间不存在相关性 (Kendall's tau-b = ± 0.45, $P = 0.13$)。其中 H272R 突变在上海草莓灰霉病菌中发生最普遍, 处于优势地位, 低抗 (LR)、中抗 (MR) 及高抗 (HR) 菌株中均检测到了该突变; 而 P225F 突变发生较少, 仅在高抗性病原菌中被检测到(表 3)。

3 小结与讨论

病原菌对杀菌剂的敏感性检测是制定病害科

表 2 上海市各区 (县) 草莓灰霉病菌菌丝生长对啉酰菌胺的敏感性水平及频率

Table 2 Sensitivity and resistance frequency of the mycelial growth of *B. cinerea* from strawberry in different districts in Shanghai

菌株来源 Source of strains	抗性分级 Resistance scales							
	敏感 (S) Sensitive(S)		低抗 (LR) Low resistance(LR)		中抗 (MR) Medium resistance(MR)		高抗 (HR) High reistance(HR)	
	EC ₅₀ 范围 Range of EC ₅₀ /(μg/mL)	频率 Frequency/ %	EC ₅₀ 范围 Range of EC ₅₀ /(μg/mL)	频率 Frequency/ %	EC ₅₀ 范围 Range of EC ₅₀ /(μg/mL)	频率 Frequency/ %	EC ₅₀ 范围 Range of EC ₅₀ /(μg/mL)	频率 Frequency/ %
崇明县 Chongming County	0.60~2.45	90.00	16.58	3.33	96.90	3.33	>110	3.33
奉贤区 Fengxian District	0.44~1.74	73.33	—	0	78.12	3.33	>110	23.33
嘉定区 Jiading District	0.58~2.28	60.00	20.11~37.38	6.67	73.92~94.26	10.00	>110	23.33
金山区 Jinshan District	0.15~1.63	70.00	23.24~29.84	6.67	55.98~61.97	6.67	>110	16.67
浦东新区 Pudong New District	0.40~1.74	53.33	—	0	—	0	>110	46.67
青浦区 Qingpu District	0.33~2.01	73.33	28.88~39.95	6.67	55.51~84.87	6.67	>110	13.33
总计 Total	0.15~2.45	70.26	16.58~39.95	4.10	55.51~94.26	5.13	>110	20.51

表 3 20 株草莓灰霉病菌对啉酰菌胺的抗性及 SdhB 亚基突变类型

Table 3 Resistance to boscalid and mutation types in SdhB subunit of 20 *B. cinerea* isolates

病原菌菌丝生长抗性表型 Resistance phenotype (mycelial growth)	菌株编号 No. of strains	抑制菌丝生长 EC ₅₀ 值 (均值 ± 标准差) EC ₅₀ value of mycelial growth/ (μg/mL)(Mean ± SD)	SdhB 突变类型 Mutation type in SdhB
敏感 (S) Sensitive(S)	2017BCCMQP0106	1.33 ± 0.13	无 None
	2017BCCMQP0101	1.21 ± 0.25	无 None
	2017BCCMCM0206	1.41 ± 0.11	无 None
	2017BCCMPD0101	1.09 ± 0.20	无 None
	2017BCCMFX0101	0.68 ± 0.08	无 None
低抗 (LR) Low reistance(LR)	2017BCCMCM0106	16.58 ± 3.32	H272R(CAC to CGC)
	2017BCCMJD0104	20.11 ± 4.43	H272R(CAC to CGC)
	2017BCCMJS0202	23.24 ± 2.87	H272R(CAC to CGC)
	2017BCCMJD0114	37.38 ± 4.55	H272R(CAC to CGC)
	2017BCCMJS0105	29.84 ± 6.02	H272R(CAC to CGC)
中抗 (MR) Medium resistance(MR)	2017BCCMCM0101	96.9 ± 7.80	H272R(CAC to CGC)
	2017BCCMFX0114	78.12 ± 9.56	H272R(CAC to CGC)
	2017BCCMJD0107	81.22 ± 10.22	H272R(CAC to CGC)
	2017BCCMJS0112	61.97 ± 9.89	H272R(CAC to CGC)
	2017BCCMQP0103	84.87 ± 6.58	H272R(CAC to CGC)
高抗 (HR) High resistance(HR)	2017BCCMPD0208	>110	P225F(CCC to TTC)
	2017BCCMJD0101	>110	H272R(CAC to CGC)
	2017BCCMJS0102	>110	H272R(CAC to CGC)
	2017BCCMQP0301	>110	H272R(CAC to CGC)
	2017BCCMPD0201	>110	P225F(CCC to TTC)

学防控策略的重要基础工作^[19]。本研究表明, 上海地区 6 个草莓主产区的灰霉病菌对啉酰菌胺的敏感性已出现一定分化, 抗性频率达 29.74%。其中, 啉酰菌胺对 20.51% 的菌株菌丝生长的 EC₅₀ 值 > 110 μg/mL, 且对随机选取的 18 株抗性菌株孢子

萌发的 EC₅₀ 值均大于 50 μg/mL, 表明啉酰菌胺已几乎丧失对这部分菌株的抑制效果。因此, 对于抗性菌株频率较高的浦东新区、嘉定等地区的草莓种植基地, 应及时调整施药方案, 减少啉酰菌胺的用药频次, 可轮换使用其他负交互抗性的药

剂种类, 并密切监测病原菌对啶酰菌胺的敏感性变化动态, 以避免防治失败。

本研究中, 啶酰菌胺对符合正态分布的 137 株病原菌菌丝生长的 EC_{50} 均值为 $(1.11 \pm 0.44) \mu\text{g/mL}$, 对 40 株敏感菌株孢子萌发的 EC_{50} 均值为 $(0.58 \pm 0.25) \mu\text{g/mL}$ 。与 Zhang 等针对中国浙江和江苏番茄、黄瓜等温室蔬菜上灰霉病菌建立的菌丝生长和孢子萌发敏感基线 $[(1.07 \pm 0.11) \text{ 和 } (0.42 \pm 0.05) \mu\text{g/mL}]$ 较为接近^[15], 而与 Myresiotis 等针对希腊克里特岛番茄、茄子等蔬菜上灰霉病菌建立的敏感基线 $(2.09 \text{ 和 } 2.14 \mu\text{g/mL})$ 有一定差别^[20], 其差异可能由不同病原菌种群的不同地理位置和寄主条件等所造成^[21]。本研究获得的啶酰菌胺对草莓灰霉病菌敏感群体菌丝生长和孢子萌发的 EC_{50} 均值及频率分布, 可作为上海及附近地区草莓灰霉病菌种群对啶酰菌胺抗性监测的参考数据之一。

本研究中, 病原菌孢子萌发与菌丝生长对啶酰菌胺的抗性表现一致, 且孢子萌发对啶酰菌胺的抑制更为敏感(敏感菌株 EC_{50} 值 $< 1.21 \mu\text{g/mL}$, 抗性菌株 EC_{50} 值 $> 50 \mu\text{g/mL}$)。参照 Fernández-ortuño 等^[1]将在 $50 \mu\text{g/mL}$ 啶酰菌胺下孢子能正常萌发的菌株归为抗性菌株这一观点, 笔者认为, 孢子萌发抑制法(含 $50 \mu\text{g/mL}$ 啶酰菌胺的 WA 培养基)更适用于 *B. cinerea* 对啶酰菌胺抗性的快速检测。

目前, 美国、意大利、德国等多个国家田间已发现 *B. cinerea* 对啶酰菌胺的抗性突变菌株^[1, 11, 22]。据现有研究报道, 多数情况下病原菌对啶酰菌胺的抗性与其线粒体上琥珀酸脱氢酶 SdhB 亚基氨基酸链上 225 及 272 等位点的氨基酸发生突变有关, 包括 P225L/F/T 和 H272Y/R/L^[10, 13], 其中 H272Y 与 H272R 突变较为常见^[11]。本研究中对 20 株菌株 SdhB 序列的比对结果显示, H272R 突变在上海草莓灰霉病菌中发生最普遍, 另有少数菌株发生了 P225F 突变。突变发生(H272R 或 P225F)与抗性产生有强相关性, 而抗性水平与突变类型无显著相关性。除了靶标位点基因发生突变外, Kretschmer 等^[23]与 Leroux 等^[11]研究发现, 膜转运蛋白基因的过表达同样会导致 *B. cinerea* 对包括啶酰菌胺在内的多种氧化呼吸链抑制剂产生低到中等水平抗性, 例如, 调控 ABC (ATP-binding cassette) 家族 AtrB 转运蛋白的转录因子

(Mrr1) 发生突变, 以及编码 MFS (major facilitator superfamily) 家族膜转运蛋白基因 *mfsM2* 的启动子区因转座子插入而激活表达等。这种机制或许能够解释本研究中 13 株抗性菌株虽然均有 H272R 突变发生, 但却表现出不同抗性水平的现象。关于本研究中的抗性菌株是否存在两种抗药机制的叠加作用等仍有待进一步研究。

参考文献 (Reference):

- [1] FERNÁNDEZ-ORTUÑO D, CHEN F P, SCHNABEL G. Resistance to pyraclostrobin and boscalid in *Botrytis cinerea* isolates from strawberry fields in the Carolinas[J]. Plant Dis, 2012, 96(8): 1198-1203.
- [2] 王春艳. 草莓灰霉病发生危害及防治研究初报[J]. 植物保护, 1997, 23(3): 32-33.
WANG C Y. Study on the damage and prevention of strawberry grey mould[J]. Plant Prot, 1997, 23(3): 32-33.
- [3] WILLIAMSON B, TUDZYNSKI B, TUDZYNSKI P, et al. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease[J]. Mol Plant Pathol, 2007, 8(5): 561-580.
- [4] 曹婷婷, 高吉良, 陆丹, 等. 草莓灰霉病发病规律及综合防治技术研究进展[J]. 浙江农业科学, 2016, 57(12): 2045-2047.
CAO T T, GAO J L, LU D, et al. Research progress on the pathogenesis and comprehensive control of strawberry grey mould[J]. J Zhejiang Agric Sci, 2016, 57(12): 2045-2047.
- [5] 颜范勇, 刘冬青, 司马利锋, 等. 新型烟酰胺类杀菌剂——啶酰菌胺[J]. 农药, 2008, 47(2): 132-135.
YAN F Y, LIU D Q, SIMA L F, et al. Boscalid, a novel carboxamide aka anilide class of fungicides[J]. Agrochemicals, 2008, 47(2): 132-135.
- [6] 张颂函, 陈秀, 赵莉, 等. 6 种杀菌剂防治草莓灰霉病的田间药效评价[J]. 世界农药, 2015, 37(5): 47-49.
ZHANG S H, CHEN X, ZHAO L, et al. Evaluation of control efficacy of six fungicides against gray mold rot of strawberry[J]. World Pestic, 2015, 37(5): 47-49.
- [7] 中华人民共和国农业部农药检定所. 农药登记数据: 有效成分——啶酰菌胺[EB/OL].[2018-04-03]. <http://www.icama.org.cn/hysj/index.jhtml>.
Pesticide Examination Institute of the Ministry of Agriculture, the People's Republic of China. Pesticide registration date, active ingredient, boscalid[EB/OL].[2018-04-03]. <http://www.icama.org.cn/hysj/index.jhtml>.
- [8] Fungicide Resistance Action Committee (FRAC). Publications: pathogen risk list[EB/OL]. [2018-04-03]. <http://www.frac.info/publications>.
- [9] Fungicide Resistance Action Committee (FRAC). Publications: list of resistant plant pathogens[EB/OL]. [2018-04-03]. <http://www.frac>.

[info/publications.](#)

[10] YIN Y N, KIM Y K, XIAO C L. Molecular characterization of boscalid resistance in field isolates of *Botrytis cinerea* from apple[J]. *Phytopathology*, 2011, 101(8): 986-995.

[11] LEROUX P, GREDT M, LEROCH M, et al. Exploring mechanisms of resistance to respiratory inhibitors in field strains of *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mold[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(19): 6615-6630.

[12] HORSEFIELD R, YANKOVSKAYA V, SEXTON G, et al. 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[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(11): 7309-7316.

[13] DE MICCOLIS ANGELINI R M, HABIB W, ROTOLO C, et al. Selection, characterization and genetic analysis of laboratory mutants of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) resistant to the fungicide boscalid[J]. *Eur J Plant Pathol*, 2010, 128(2): 185-199.

[14] 农药室内生物测定试验准则 杀菌剂第 2 部分: 抑制病原真菌菌丝生长试验 平皿法: NY/T 1156.2—2006[S]. 北京: 中国农业出版社, 2006.

Pesticides guidelines for laboratory bioactivity tests part 2: petri plate test for determining fungicide inhibition of mycelial growth: NY/T 1156.2—2006[S]. Beijing: China Agriculture Press, 2006.

[15] ZHANG C Q, YUAN S K, SUN H Y, et al. Sensitivity of *Botrytis cinerea* from vegetable greenhouses to boscalid[J]. *Plant Pathol*, 2007, 56(4): 646-653.

[16] 赵建江, 路粉, 吴杰, 等. 河北省设施番茄灰霉病菌对啮酰菌胺和咯菌腈的敏感性[J/OL]. *植物病理学报*, 2017, doi: 10.13926/j.cnki.apps.000135.

ZHAO J J, LU F, WU J, et al. Sensitivity of *Botrytis cinerea* from greenhouses in Hebei Province to boscalid and fludioxonil[J/OL]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2017, doi: 10.13926/j.cnki.apps.000135.

[17] 农药室内生物测定试验准则 杀菌剂第 1 部分: 抑制病原真菌孢子萌发试验 凹玻片法: NY/T 1156.1—2006[S]. 北京: 中国农业出版社, 2006.

Pesticides guidelines for laboratory bioactivity tests part 1: determining fungicide inhibition of pathogen spore germination on concave slides: NY/T 1156.1—2006[S]. Beijing: China Agriculture Press, 2006.

[18] HARJU S, FEDOSYUK H, PETERSON K R. Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n' Grab[J]. *BMC Biotechnol*, 2004, 4: 8.

[19] Fungicide Resistance Action Committee (FRAC). Publications: sensitivity baselines in fungicide resistance research and management[EB/OL]. [2018-04-03]. <http://www.frac.info/publications>.

[20] MYRESIOTIS C K, BARDAS G A, KARAOGLANIDIS G S. Baseline sensitivity of *Botrytis cinerea* to pyraclostrobin and boscalid and control of anilinopyrimidine- and benzimidazole-resistant strains by these fungicides[J]. *Plant Dis*, 2008, 92(10): 1427-1431.

[21] 郭建国, 杨凤珍, 杜惠, 等. 甘肃玉米大斑病菌对啮菌酯的敏感基线 与抗药性监测[J]. *植物保护学报*, 2015, 42(6): 1044-1049.

GUO J G, YANG F Z, DU H, et al. Monitoring of resistance and baseline sensitivity of *Setosphaeria turcica* to azoxystrobin in Gansu[J]. *J Plant Prot*, 2015, 42(6): 1044-1049.

[22] PANEBIANCO A, CASTELLO I, CIRVILLERI G, et al. Detection of *Botrytis cinerea* field isolates with multiple fungicide resistance from table grape in Sicily[J]. *Crop Prot*, 2015, 77: 65-73.

[23] KRETSCHMER M, LEROCH M, MOSBACH A, et al. Fungicide-driven evolution and molecular basis of multidrug resistance in field populations of the grey mould fungus *Botrytis cinerea*[J]. *PLoS Pathog*, 2009, 5(12): e1000696.

(责任编辑: 唐 静)