

烟草赤星病菌对啞菌酯抗性突变体的诱导及其生物学特性

黄艳飞^{1,2}, 汪汉成^{*2}, 吴庆丽¹, 陈兴江², 蔡刘体²,
张长青^{*3}, 阳 淑¹, 何永福^{*4}

(1. 成都农业科技职业学院 园林园艺分院, 成都 611130; 2. 贵州省烟草科学研究院, 贵阳 550081;
3. 长江大学 农学院, 湖北 荆州 434025; 4. 贵州省农业科学院 植物保护研究所, 贵阳 550006)

摘要: 为评价烟草赤星病致病菌链格孢 *Alternaria alternata* 对啞菌酯的抗性风险, 以敏感菌株 J6 为试材, 通过菌丝药剂驯化和分生孢子紫外诱变诱导抗性突变体, 并对抗性突变体的生物学特性进行了研究, 同时对抗性突变体与敏感菌株线粒体的细胞色素 b 基因 (*cyt b*) cDNA 序列全长进行了测序分析。结果表明: 经药剂驯化未获得抗性突变体, 而紫外诱变共获得 7 株抗性突变体, 突变频率约为 0.007%, 抗性水平分别为 5.27、8.28、25.28、12.82、6.14、9.28 和 52.91 倍。适合度研究表明, 抗性突变体与敏感菌株的分生孢子萌发能力及致病力相当, 但分生孢子产生量均高于敏感菌株, 菌丝生长速率除突变体 6-1 外均快于敏感菌株。*cyt b* 基因 cDNA 序列分析表明: 有 4 株抗性突变体在不同位点上发生了核苷酸突变, 其中突变体 6-7 *cyt b* 的 249 位和 871 位碱基由 T 突变为 C, 但其编码的氨基酸未发生突变; 突变体 6-8 *cyt b* 的 734 位碱基由 T 突变为 C, 引起所编码的 245 位丙氨酸突变为缬氨酸 (V245A); 突变体 6-9 *cyt b* 的 510 位碱基由 T 突变为 A, 所编码的 170 位由精氨酸替代了丝氨酸 (S170R); 突变体 6-11 *cyt b* 的 732 位碱基由 T 突变为 A, 所编码的 244 位由苯丙氨酸替代了亮氨酸 (L244F), 其 776 位碱基由 T 突变为 C, 所编码的 259 位由丙氨酸替代了缬氨酸 (V259A), 其 1 156 位碱基由 A 突变为 G, 所编码的氨基酸未发生变化。研究结果初步表明, 烟草赤星病菌对啞菌酯存在潜在的抗药性风险, 其 *cyt b* 基因的点突变与其对啞菌酯的抗药性有关。

关键词: 烟草赤星病; 链格孢; 啞菌酯; 抗性; 突变体; 紫外诱导; 生物学特性

中图分类号: S482.2; S481.4 文献标志码: A 文章编号: 1008-7303(2019)04-0416-08

Induction and biological characterization of mutants of *Alternaria alternata* resistant to azoxystrobin

HUANG Yanfei^{1,2}, WANG Hancheng^{*2}, WU Qingli¹, CHEN Xingjiang²,
CAI Liuti², ZHANG Changqing^{*3}, YANG Shu¹, HE Yongfu^{*4}

收稿日期: 2019-03-12; 录用日期: 2019-06-13.

基金项目: 国家自然科学基金 (31360448); 中国烟草总公司贵州省科技项目 (201711, 201714, 201920); 贵州省科技厅优秀青年人才培养计划 (黔科合平台人才 [2017]5619); 成都农业科技职业学院院级科研基金项目 (cny19-17); 国家重点研发计划特色经济作物化肥农药减施技术集成研究与示范 (2018YFD0201100) .

作者简介: 黄艳飞, 女, 硕士, 助教, 主要从事植物病虫害防治研究, **E-mail:** 974603170@qq.com; *汪汉成, 通信作者 (Author for correspondence), 男, 博士, 研究员, 主要从事植物保护及烟草微生物学研究, **E-mail:** xiaobaiyang126@hotmail.com; *张长青, 共同通信作者 (Co-author for correspondence), 男, 教授, 主要从事植物保护教学与科研工作, **E-mail:** qingchangzhang@tom.com; *何永福, 共同通信作者 (Co-author for correspondence), 男, 研究员, 主要从事植物保护研究, **E-mail:** 3258800369@qq.com

- (1. Subcollege of Gardening and Horticulture, Chengdu Agricultural College, Chengdu 611130, China;
2. Guizhou Academy of Tobacco Science, Guiyang 550081, China;
3. College of Agriculture, Yangtze University, Jingzhou 434025, Hubei Province, China;
4. Institute of Plant Protection, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang 550006, China)

Abstract: The resistance risk of *Alternaria alternata* to azoxystrobin was evaluated. Mycelial plugs of the sensitive parent isolate J6 was inoculated onto agar plates amended with azoxystrobin and the conidia of J6 was induced with UV irradiation. The biological characterization of resistant mutants was studied, and the resistance mechanism of mutants was also investigated by the full-length cDNA of target gene *cyt b* sequence analysis. Seven mutants of *A. alternata* resistant to azoxystrobin were acquired by UV-induced mutation of conidia, which exhibited a mutation frequency of around 0.007%. The resistance ratios for seven mutants were 5.27, 8.28, 25.28, 12.82, 6.14, 9.28 and 52.91, respectively. However, no mutants were obtained by mycelial plug transferring on the agar plates amended with azoxystrobin. Studies on biological characters of the wild-type and mutant strains of *A. alternata* showed that all resistant mutants and the parent isolate J6 had equal abilities in the conidia germination and pathogenicity, while resistant mutants had higher conidia production ability and stronger mycelial growth ability (except mutant 6-1) than those of J6. Sequence analysis of the full-length cDNA sequence of *cyt b* gene showed that there were different point mutations on four mutations of *A. alternata*. Mutant 6-7 showed mutations at 249 and 871 positions (T mutated to C), while no amino acids mutated. Mutant 6-8 had a point mutation at 734 position (T mutated to C), which resulted in alanine mutated to valine (V245A). Mutant 6-9 had a point mutation at 510 position (T mutated to A), which resulted in arginine mutated to serine (S170R). And mutant 6-11 had a mutation at 732 position (T mutated to A), which resulted in leucine mutated to phenylalanine (L244F); had a mutation at 776 position (T mutated to C), which resulted in valine mutated to alanine (V259A); and had a mutation at 1156 position (A mutated to G), while no amino acids mutated. These studies suggested that *A. alternata* has the potential resistant risk to azoxystrobin, and the mutation of *cyt b* gene in *A. alternata* was related to the resistance to azoxystrobin.

Keywords: tobacco brown spot; *Alternaria alternata*; azoxystrobin; resistance; mutant; UV-induced; biological characterization

由链格孢 *Alternaria alternata* (Frises) Keissler 引起的烟草赤星病 (tobacco brown spot) 是危害烟草品质的主要真菌性病害, 通常在烟株生长的中后期发生, 具有传染快、难防治等特点^[1], 一旦环境适宜不仅直接导致产量损失, 而且严重影响烟叶品质, 降低烘烤价值, 威胁烟草生产^[2-6]。长期以来, 使用化学药剂是防治赤星病的主要手段, 常用药剂有菌核净 (dimetachlone) 及代森锰锌 (mancozeb) 等^[7]。然而, 长期高频率使用这些农药已使得烟草赤星病菌群体出现了严重的抗药性^[8-11], 因此亟待寻找高效的替代药剂。

近年来, 甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂陆续在中国取得登记, 啞菌酯 (azoxystrobin) 是其中的典型

代表。啞菌酯主要作用于真菌线粒体呼吸链中复合物 III (细胞色素 bc1 复合物) *cyt b* 的 Qo 结合部位, 阻断电子由 *cyt bc1* 复合物流向 *cyt c*, 破坏能量合成, 干扰呼吸作用^[12-14]。啞菌酯对多种植物病原菌具有较高的生物活性, 已被用于防治包括链格孢属真菌病害在内的多种植物病害^[8-12]。该药剂被认为是具有中-高等抗药性风险的杀菌剂^[15]。目前, 被报道已对甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂产生抗性的链格孢属病原菌有链格孢 *A. alternata*、极细链格孢 *A. tenuissima*、茄链格孢 *A. solani* 和苹果褐斑病菌 *A. mali*^[8,12,16]。已有研究表明, 链格孢属真菌对啞菌酯产生抗性的机理是 *cyt b* 基因的突变, 已报道的突变位点包括 143 位的甘氨酸突变为丙

氨酸 (G143A)、129 位的亮氨酸突变为苯丙氨酸 (F129L) 以及 137 位的精氨酸突变为甘氨酸 (G137R) [11,17-18]。笔者等前期研究发现, 嘧菌酯对链格孢具有较强的生物活性, 且田间对赤星病也有较好的防治效果 [19]。嘧菌酯在欧美已被用于烟草赤星病的防治, 但目前尚未在中国烟草上正式登记使用。此外, 也未发现烟草赤星病菌对甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂产生抗性的报道, 其对嘧菌酯的抗性风险目前尚不清楚。为此, 本研究以烟草赤星病菌敏感性菌株为对象, 对其进行了嘧菌酯抗性突变体的诱导, 并对突变体的生物学特性进行了研究, 以期嘧菌酯在烟草赤星病防治上应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 病原菌及培养条件

烟草赤星病菌 *A. alternata* 敏感菌株 J6 (MK922251) 和 C2 (MK803324), 由贵州省烟草科学研究院微生物实验室分离并鉴定。其中, J6 用于嘧菌酯抗性突变体诱导, J6 和 C2 均用于烟草赤星病菌细胞色素 b 基因 (*cyt b*) cDNA 的分析。马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA 培养基: 去皮马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 20 g、蒸馏水 1 000 mL) 用于病原菌对嘧菌酯敏感性测定、分生孢子的诱导及病原菌的保存; 马铃薯葡萄糖液体培养基 (PD 培养基: 去皮马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、蒸馏水 1 000 mL) 用于病原菌的液体培养。

1.2 药剂及试剂

99.9% 嘧菌酯 (azoxystrobin) 原药购自美国 Sigma-Aldrich 公司, 溶于甲醇配成 1.0×10^4 mg/L 的母液; 旁路氧化途径抑制剂水杨脞酸 (SHAM, 99%) 购自美国 Acros Organics 公司, 溶于甲醇配成 1.0×10^5 mg/L 的母液。用无菌水将上述母液稀释成系列浓度的药液, 于 4 °C 黑暗条件下保存, 备用。药液中甲醇的体积分数小于 0.5%, 此浓度的甲醇不影响烟草赤星病菌分生孢子的萌发 (数据略)。以加入相同体积分数甲醇的处理作为空白对照。Fungal RAN Kit (D3390-01) 真菌 RNA 提取试剂盒, 购自美国 Omega Biotek Inc 公司; FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒 (KR106), 购自天根生化科技 (北京) 有限公司; PrimeSTAR® GXL Premix (Code No.R051) 酶, 购自宝生物工程 (大连) 有限公司。

1.3 抗性突变体的诱导

紫外诱变 [20]: 将敏感菌株 J6 于 PDA 平板上预培养 4 d, 在菌落边缘制取直径 5 mm 的菌碟, 置于 PDA 平板上, 25 °C 培养 10 d 后。用无菌水洗涤孢子, 制成浓度为每毫升含 1.0×10^5 个分生孢子的悬浮液, 备用。制备含 100 mg/L 嘧菌酯的 PDA 平板, 吸取 100 μ L 分生孢子悬浮液涂布于平板上, 预培养 2 h 后, 置于紫外灯下 (40 W, 垂直距离 15 cm) 照射 20 min, 照射后的平板置于 25 °C 恒温培养箱中黑暗培养 7 d。从长出的菌落边缘挑取少量菌丝继续培养, 直至产孢, 收集分生孢子并将其涂布于含 100 mg/L 嘧菌酯的 PDA 平板上进行萌发生长验证, 能够正常生长的即为抗性突变体。

药剂驯化: 在预培养 4 d 的菌落边缘打取直径 5 mm 的菌饼, 接种于含 500 mg/L 嘧菌酯的 PDA 平板上, 25 °C 恒温培养, 直至扇形突变菌落出现。共处理 200 个菌饼, 将获得的突变体在含 500 mg/L 嘧菌酯的平板上进行生长验证, 能够正常生长的即为抗性突变体。

1.4 室内敏感性测定

采用孢子萌发法 [21] 测定烟草赤星病菌敏感和抗性突变体对嘧菌酯的敏感性。分别将 0.50 mL 各浓度药液与 0.50 mL 孢子悬浮液混合均匀, 取 100 μ L 各浓度混合液滴于载玻片上, 置于保湿培养皿中, 28 °C、黑暗条件下培养 12 h。嘧菌酯单独作用时的最终供试质量浓度分别为 0、6.25、12.5、25、50 和 100 mg/L; 在 100 mg/L 水杨脞酸协同下, 嘧菌酯的最终供试质量浓度分别为 0、3.125、6.25、12.5、25、50 和 100 mg/L。当空白对照孢子萌发率达到 90% 以上时, 检查各处理孢子萌发情况, 以孢子芽管长度大于孢子的短半径时视为萌发。每处理重复 3 次, 随机观察 3 个视野, 调查孢子总数不少于 200 个, 记录孢子萌发数及孢子总数, 根据公式 (1) 和 (2) 分别计算药剂各浓度处理下的孢子萌发率及抑制率。

$$R/\% = N_g/N_t \times 100 \quad (1)$$

$$I/\% = (R_0 - R_t)/R_0 \times 100 \quad (2)$$

式 (1) 中, R 为孢子萌发率, N_g 为孢子萌发数, N_t 为检查孢子总数; 式 (2) 中 I 为孢子萌发相对抑制率, R_0 为对照孢子萌发率, R_t 为处理孢子萌发率。

1.5 适合度测定

以敏感亲本菌株为对照,分别测定各抗药性突变体的菌丝生长能力、离体平板上的分生孢子产生量、分生孢子的萌发率及其对烟叶的致病力。

1.5.1 菌丝生长能力测定 从预培养 4 d 的菌落边缘制取直径 5 mm 的菌饼,置于无药 PDA 平板中央,25 °C 黑暗条件下培养,6 d 后按照“十字交叉法”量取菌落直径。每个菌株 3 次重复。

1.5.2 分生孢子产量与萌发率测定 参照 Caten 等报道的孢子产量测定方法^[21],测定各抗药性突变体在平板上的产孢子能力。在同一平板内,用 5 mm 直径打孔器分别在距菌落边缘 2 mm 处和距接菌饼 2 mm 处制取菌饼;从两处各随机挑取 3 个菌饼,合并置于 2 mL 离心管中。向离心管中加入 1 mL 无菌水,涡旋 20 s 洗下分生孢子,置于显微镜下检查孢子数量,计算单位面积上的产孢量。每菌株 3 次重复。分生孢子萌发能力测定按 1.4 节方法进行。

1.5.3 致病力测定 采用离体叶片法^[22]测定各抗药性突变体的致病力。每菌株选取 3 片无病的成熟期烟叶,于每叶片同一部位刺制相同的伤口,在伤口处接种直径 5 mm 的菌饼,置于 28 °C、相对湿度 > 80%、每天 12 h 光照/12 黑暗条件下培养,5 d 后观察各处理的发病情况。十字交叉法量取病斑直径,计算各突变菌株的致病面积,以发病面积评价其致病力^[23]。

1.6 *cyt b* 基因 cDNA 扩增与序列分析

将敏感菌株和突变体于 PDA 平板上预培养 4 d 后,在菌落边缘分别制取 5 个直径 5 mm 的菌碟,加入 150 mL PD 液体培养基中摇培 4 d,无菌条件下过滤获得各菌株菌丝。采用 Fungal RAN Kit,参照试剂盒使用说明提取亲本菌株和抗性突变体的 RNA。利用 FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒,将突变体和敏感菌株的 RNA 反转录成 cDNA。利用全长引物(RC205): RC205-UF (5'-ATGAGAATATTA AAAAGTCATTCAATT -3') 和 RC205-DR (5'-TATCATGATATATTA AAAA-AAAGTTCG-3') 对细胞色素 b 基因的 cDNA 全长序列进行 PCR 扩增,扩增条件为: PrimeSTAR® GXL Premix 酶 25 μL, RC205-UF 及 RC205-DR 各 1 μL, Template 2 μL, 加重蒸水 21 μL 补足至 50 μL 体系。PCR 循环条件为: 95 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 90 s, 72 °C 延伸 60 s,

共 35 个循环;最终于 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经纯化后,参照质粒 pMD19-T (TaKaRa, D102A) 的连接方法将其连至载体上,将验证后的转化子送生工生物工程上海(股份)有限公司测序,分析突变体 *cyt b* 的 cDNA 碱基及氨基酸变化情况。

1.7 数据分析

采用 Microsoft Excel 2010 软件进行数据处理,以药剂浓度的对数值为横坐标,以对病原菌分生孢子萌发抑制率的对数值为纵坐标,建立线性回归方程,并进行相关性分析,计算啞菌酯抑制孢子萌发的 EC₅₀ 值。通过 DPS (7.05) 软件进行统计分析。根据公式 (3) 计算抗性突变体的抗性倍数 (R_F)。

$$R_F = EC_{50(x)} / EC_{50(s)} \quad (3)$$

式中, EC_{50(x)} 为被测菌株 X 的 EC₅₀ 值, EC_{50(s)} 为敏感菌株的 EC₅₀ 值^[23]。采用 NCBI BLAST 软件分析突变体与亲本菌株之间发生突变的碱基及氨基酸。

2 结果与分析

2.1 抗药性突变体的诱导

结果表明,通过室内药剂驯化方式并未获得烟草赤星病菌对啞菌酯的抗性突变体,而含药平板上的紫外诱导共获得 7 株抗性突变体,分别命名为 6-1、6-3、6-5、6-7、6-8、6-9 及 6-11,诱变率为 0.007%。

2.2 室内敏感性测定

在 0~100 mg/L 测试质量浓度范围内,随着啞菌酯处理浓度升高,对分生孢子萌发的抑制作用均逐渐增强(表 1)。其中,啞菌酯 100 mg/L 单独作用时,亲本菌株 J6 分生孢子不能萌发,而突变体的均能萌发;在 100 mg/L 水杨脞酸的协同下,亲本菌株 J6 分生孢子在啞菌酯质量浓度为 6.25 mg/L 时即不能萌发,而突变体除 6-8 外均能在啞菌酯最高测试质量浓度(100 mg/L)下萌发。

研究表明,所有抗药性突变体对啞菌酯的敏感性均有所降低:啞菌酯单独作用时,抑制亲本菌株孢子萌发的 EC₅₀ 值为 5.66 mg/L,而对突变体的 EC₅₀ 值均 > 50 mg/L;在 100 mg/L 水杨脞酸的协同下,对敏感菌株 J6 孢子萌发的 EC₅₀ 值为 0.22 mg/L,而突变体的 EC₅₀ 值均 > 1 mg/L (表 2)。

表 1 啞菌酯及其在水杨羟酸协同下对烟草赤星病菌敏感和抗性突变体孢子萌发的影响

Table 1 Conidia germination sensitivity of *A. alternata* to azoxystrobin among sensitive and resistant isolates with the synergism of salicylhydroxamic acid

| 处理 Treatment | 质量浓度 Mass conc./(mg/L) | 孢子萌发率 Germination ratio/% | | | | | | | |
|-------------------------------|---------------------------|------------------------------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | | J6* | 6-1 | 6-3 | 6-5 | 6-7 | 6-8 | 6-9 | 6-11 |
| 啞菌酯 azoxystrobin | 0 | 98.03 a | 99.00 a | 92.20 a | 99.00 a | 91.50 a | 97.00 a | 100.00 a | 91.60 a |
| | 6.25 | 53.90 b | 85.50 b | 90.00 a | 80.0 b | 90.00 a | 88.30 b | 88.30 b | 84.90 b |
| | 12.5 | 42.60 c | 67.51 c | 71.60 b | 64.0 c | 70.80 b | 80.00 bc | 76.40 c | 78.20 c |
| | 25 | 38.83 d | 66.70 c | 60.20 c | 63.10 c | 60.90 c | 65.80 c | 72.90 c | 76.10 c |
| | 50 | 20.54 e | 43.82 d | 50.70 d | 62.80 c | 54.80 cd | 65.30 c | 69.40 d | 67.80 d |
| | 100 | 0 | 33.71 e | 40.70 e | 56.10 d | 54.00 d | 54.70 d | 39.20 e | 54.70 e |
| 啞菌酯+水杨羟酸 azoxystrobin+SHAM | 0 | 99.00 a | 98.00 a | 100.00 a | 100.00 a | 100.00 a | 100.00 a | 100.00 a | 100.00 a |
| | 3.13 | 1.50 b | 42.70 b | 41.30 b | 59.20 b | 49.10 b | 37.30 b | 36.70 b | 85.00 b |
| | 6.25 | 0 | 33.50 c | 33.00 c | 44.20 c | 41.20 b | 22.70 c | 32.51 b | 50.41 c |
| | 12.5 | 0 | 26.25 d | 28.80 c | 35.50 d | 30.00 c | 20.00 c | 30.40 b | 36.10 d |
| | 25 | 0 | 25.50 d | 15.30 d | 32.60 d | 26.70 c | 11.60 d | 16.10 c | 29.40 e |
| | 50 | 0 | 24.20 d | 14.70 d | 9.30 e | 17.50 d | 6.00 e | 15.80 c | 28.60 f |
| | 100 | 0 | 14.80 e | 7.40 e | 5.30 e | 14.10 d | 0 | 3.30 d | 25.60 f |

注：同列数据后不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。*J6 为敏感菌株，其余为抗性突变体。

Note: Different letters within the same column represent significant difference at 5% level. *J6 was sensitive parent isolate, the others were resistant isolates.

表 2 啞菌酯及其在水杨羟酸协同下对烟草赤星病菌敏感及抗性突变体的毒力及抗性倍数

Table 2 Toxicity and resistance factor of azoxystrobin with salicylhydroxamic acid to the sensitive and resistant isolates of *A. alternata*

| 菌株 Isolates | EC ₅₀ /(mg/L) | | 抗性倍数 Resistance factor |
|----------------|--------------------------|-------------------------------|---------------------------|
| | 啞菌酯 azoxystrobin | 啞菌酯+水杨羟酸 azoxystrobin+SHAM | |
| J6 | 5.66 | 0.22 | — |
| 6-1 | 54.04 | 1.16 | 5.27 |
| 6-3 | 73.62 | 1.82 | 8.28 |
| 6-5 | 445.55 | 5.56 | 25.28 |
| 6-7 | 123.02 | 2.82 | 12.82 |
| 6-8 | 213.50 | 1.35 | 6.14 |
| 6-9 | 84.14 | 2.04 | 9.28 |
| 6-11 | 239.77 | 11.64 | 52.91 |

注：*J6 为敏感菌株，其余为抗性突变体。

Note: *J6 was sensitive parent isolate, the others were resistant isolates.

2.3 抗性突变体的生物学特性

测定结果表明，各突变体在菌丝生长速率、产孢量、孢子萌发能力及致病力上与亲本菌株相比均存在较大差异：除 6-1 外，其余 6 株突变体的菌丝生长速率均较亲本菌株快，其中最快的为 6-5，其次分别为 6-3、6-9 和 6-8；各突变体产孢量均高于亲本菌株；各突变体的孢子萌发率均与

亲本菌株相当；在致病力方面，所有突变体均能成功侵染烟草叶片，使其发病(表 3)。

2.4 抗性突变体和亲本菌株 *cyt b* 基因的 cDNA 序列分析

利用特异性引物 RC205-UF 和 RC205-DR 对敏感菌株和抗性突变体的 *cyt b* 基因进行 PCR 扩增，其扩增片段长度均在 1 200 bp 左右，产物经纯化、链接 pMD19-T 载体及测序，成功获得了亲本菌株 J6 (MK922251) 和突变体 *cyt b* 基因的 cDNA 全长序列。比对分析表明：烟草赤星病菌敏感菌株 J6 和 C2 的 *cyt b* 基因 cDNA 序列完全相同；3 株抗性突变体 (6-1、6-3 和 6-5) 与亲本菌株在 *cyt b* 基因上完全一致，未出现核苷酸突变；其余 4 株抗性突变体 (6-7、6-8、6-9 和 6-11) 的 *cyt b* 基因 cDNA 则在不同位点上产生了变异。其中，突变体 6-7 在 249 位和 871 位、6-8 在 734 位均发生了点突变，由核苷酸 T 突变为 C；突变体 6-9 在 510 位由核苷酸 T 突变为 A；菌株 6-11 在 732 位由核苷酸 T 突变为 A，在 776 位由核苷酸 T 突变为 C，在 1 156 位由核苷酸 A 突变为 G(表 4)。

cDNA 编码氨基酸差异性分析表明：与亲本菌株相比，突变体 6-8 在 245 位由缬氨酸 V 突变为丙氨酸 A；6-9 在 170 位由丝氨酸 S 突变为精氨酸 R (S170R)；6-11 在 244 位由苯丙氨酸 F 替代了

表 3 烟草赤星病菌抗啞菌酯突变体的生物学特性

Table 3 Biological characters of the resistant and sensitive isolates of *A. alternata* to azoxystrobin

| 菌株 Isolate | 生物学特性 Biological characters | | | |
|---------------|--|---|--|--|
| | 菌丝生长速率 Mycelial growth ^a /mm | 离体产孢量/(个/cm ²) Conidia production in vitro ^b /(per/cm ²) | 分生孢子萌发率 Conidia germination ratio ^c /% | 致病力 Virulence ^d /mm ² |
| J6 | 40.50 c | 1.53 × 10 ⁷ e | 98.00 a | 199.33 cd |
| 6-1 | 39.81 c | 3.30 × 10 ⁷ a | 99.00 a | 151.00 d |
| 6-3 | 46.25 ab | 2.80 × 10 ⁷ b | 92.20 a | 219.33 bc |
| 6-5 | 47.63 a | 2.80 × 10 ⁷ b | 99.00 a | 245.33 bc |
| 6-7 | 44.25 b | 3.44 × 10 ⁷ a | 91.50 a | 253.00 b |
| 6-8 | 45.00 ab | 2.29 × 10 ⁷ c | 97.00 a | 322.00 a |
| 6-9 | 45.88 ab | 2.90 × 10 ⁷ b | 100.00 a | 249.33 b |
| 6-11 | 44.75 b | 1.78 × 10 ⁷ d | 91.60 a | 256.00 b |

注: ^aJ6 为敏感菌株, 其余为抗性突变体。^a 培养 6 d 后的平均菌落直径 ($n = 3$); ^b 培养 6 d 后的平均产孢量 ($n = 3$); ^c 培养 12 h 后分生孢子的平均萌发率 ($n = 200$); ^d 培养 5 d 后在离体叶片上的致病面积。同列数据后不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著 ($P = 0.05$)。

Note: ^aJ6 was sensitive parent isolate, the others were resistant isolates. ^a Mean colony diameter (mm) measurements 6 days after incubation ($n = 3$); ^b Mean number of conidia per cm² of colony 6 days after incubation ($n = 3$); ^c Percentage of germinated conidia 12 h after incubation ($n = 200$); ^d Virulence ability on tobacco leaves; Disease areas on detached tobacco leaves 5 days after incubation. Different letters within the same column represent significant difference at 5% level ($P = 0.05$).

表 4 抗性突变体 *cyt b* 基因 cDNA 全长序列突变位点及编码的氨基酸序列突变位点比对分析Table 4 Different point mutation comparison of *cyt b* gene from both the azoxystrobin-resistant mutants and sensitive isolate of *A. alternata* in full-length cDNA sequence and amino acid sequence

| 菌株 Isolate | <i>cyt b</i> 基因 cDNA 全长序列突变位点 The point mutation of the target gene <i>cyt b</i> | 编码的氨基酸 序列突变位点 The point mutation of the amino acid |
|---------------|---|---|
| 6-1 | 无 (No) | 无 (No) |
| 6-3 | 无 (No) | 无 (No) |
| 6-5 | 无 (No) | 无 (No) |
| 6-7 | C249T, C871T | 无 (No) |
| 6-8 | C734T | V245A |
| 6-9 | A510T | S170R |
| 6-11 | A732T, C776T, G1156A | L244 F, V259A |

亮氨酸 L, 在 259 位由丙氨酸 A 替代了缬氨酸 V; 突变体 6-1、6-3、6-5 及 6-7 则均未发生氨基酸突变 (表 4)。

3 讨论与结论

烟草赤星病发生历史悠久, 造成的经济损失严重, 在基础病理学方面的研究已经取得一定进展, 但由于受其病原菌生理小种多变及防治技术落后等诸多因素影响, 赤星病至今仍严重威胁着中国的烟草生产^[24-25]。啞菌酯作为一种高效、广谱的杀菌剂, 可抑制多种真菌 (子囊菌、担子菌和卵

菌) 孢子的萌发及产生, 也可抑制菌丝体的生长^[26], 目前已在 70 余个国家的 80 多种作物上获准登记, 广泛应用于多种植物上由链格孢属 (*Alternaria* spp.) 真菌所致病害的防治。啞菌酯于 2001 年开始在中国登记, 主要用于链格孢属所引起的番茄早疫病等病害的防治。虽然啞菌酯在欧美等国已被用于赤星病的防治, 但目前在中国尚未在烟草上正式登记, 其原因可能与经济成本及烟草行业监管政策等有关。

关于病原菌对啞菌酯抗性的问题已有大量报道。程玉峰报道马铃薯晚疫病病菌 *Phytophthora infestans* 对啞菌酯的抗性已达 52.87 倍^[27]。中国境内草莓灰霉病菌 *Botrytis cinerea* 对啞菌酯的抗性较为普遍, 抗性倍数可达 100 倍以上, 且大部分为中等抗性水平^[26]。孟润杰等报道, 河北省黄瓜霜霉病菌 *Pseudoperonospora cubensis* 对啞菌酯的抗性倍数已高达 354 倍^[28]。本研究通过分生孢子紫外诱变获得了 7 株烟草赤星病菌对啞菌酯的抗性突变体, 突变几率低, 抗性水平也不高, 其中抗性倍数在 3~15 的有 5 株, > 25 倍的有 2 株。生物适合度测定发现, 抗性菌株的分生孢子萌发能力和致病力与敏感菌株差异不明显, 其菌丝生长速率及产孢量与亲本菌株之间则存在差异, 这可能与赤星病菌的遗传变异能力较强有关。由此推测, 在大田药剂选择压力条件下, 烟草赤星病菌群体有可能出现适应能力较强的抗啞菌酯突变

体。但本研究中通过紫外诱导获得的突变体在田间环境条件下的实际适应能力及其与野生敏感菌株在田间的竞争力等还有待于进一步研究。

据报道,真菌对啞菌酯的抗性与细胞色素 b 基因 (*cyt b*) 的突变有关,主要包括 G143A^[1]、F129L 和 G137R^[17-18] 3 种突变类型,且 G143A 突变的抗性倍数一般在 100 以上, F129L 和 G137R 突变的抗性倍数通常在 5~15 之间,少数可能大于 50^[29]。本研究检测突变体的 *cyt b* 基因潜在位点均未见发生突变,而是出现了其他突变位点: V245A、S170R、L244 F 和 V 259A。本研究首次发现了新的 *cyt b* 基因突变位点,这可能与紫外诱变的随机性有关,也可能与链格孢的遗传变异能力有关,也可能是由于烟草赤星病菌对啞菌酯确实存在靶标基因以外的突变位点。为此,下一步仍需继续研究烟草赤星病菌对啞菌酯产生抗药性的潜在分子机理。

目前国际杀菌剂抗性行动委员会 (FRAC) 尚未对烟草赤星病菌进行抗药性风险评价。本研究采用药剂驯化方式未获得抗啞菌酯的烟草赤星病菌突变体,仅通过紫外诱导获得了部分抗性突变体,其田间的实际突变情况还有待进一步考证,紫外诱导所获抗性突变体的抗药性能否稳定遗传等也还有待研究。

烟草赤星病菌在一个生产季可造成多次再侵染,同时产生大量的分生孢子,这些孢子通过刮风、降雨等途径可以很容易地相互融合,从而进行遗传物质的交换与重组。虽然目前尚未发现田间烟草赤星病菌对啞菌酯产生抗药性的报道,但在使用该类药剂防治烟草赤星病时也不应忽视其抗性风险管理,应同样加强田间抗药性监测,制定合理的抗性治理策略,在早期监测预报的基础上,交替或混合施用作用机理不同的杀菌剂,并实施精准用药,在发病前或发病初期施药,避免在发病较重时进行铲除性施药等。

本研究通过紫外诱导获得了烟草赤星病菌抗啞菌酯的突变体,考查了突变体的生物学性状,并初步探究了其抗性机理。由于研究尚处于初级室内试验阶段,所得相关结果仅可为烟草赤星病菌对啞菌酯的抗性风险评估提供参考,后续还将继续深入开展研究。

参考文献 (References):

[1] JING C L, ZHAO J, HAN X B, et al. Essential oil of *Syringa oblata* Lindl. as a potential biocontrol agent against tobacco brown spot caused by *Alternaria alternata*[J]. *Crop Prot*, 2018, 104: 41-46.

- [2] BAI W M, KONG F Y, LIN Y, et al. Extract of *Syringa oblata*: a new biocontrol agent against tobacco bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*[J]. *Pestic Biochem Physiol*, 2016, 134: 79-83.
- [3] HOU Y J, MA X, WAN W T, et al. Comparative genomics of pathogens causing brown spot disease of tobacco: *Alternaria longipes* and *Alternaria alternata*[J]. *PLoS One*, 2016, 11(5): e0155258.
- [4] CHENG D D, JIA Y J, GAO H Y, et al. Characterization of the programmed cell death induced by metabolic products of *Alternaria alternata* in tobacco BY-2 cells[J]. *Physiol Plant*, 2011, 141(2): 117-129.
- [5] STAVELY J R. Relation of postinoculation leaf wetness to initiation of tobacco brown spot[J]. *Phytopathology*, 1975, 65(8): 897.
- [6] 彭希文, 刘光珍, 杨永柱, 等. 云南省烟草赤星病(tobacco brown spot)病原研究及其防治药剂的筛选[J]. *西南农业大学学报*, 2000, 22(2): 153-156.
- PENG X W, LIU G Z, YANG Y Z, et al. Identification of pathogens for brown spots on tobacco plants in Yunnan Province and selection for effective fungicides for its control[J]. *J Southwest Agric Univ*, 2000, 22(2): 153-156.
- [7] 孟建玉, 曹毅, 陆宁, 等. 贵州省烟草赤星病菌对菌核净的抗药性[J]. *植物保护学报*, 2013, 40(5): 479-480.
- MENG J Y, CAO Y, LU N, et al. Resistance of *Alternaria alternata* to dimethachlon in Guizhou Province[J]. *Acta Phytophylacica Sinica*, 2013, 40(5): 479-480.
- [8] PASCHE J S, WHARAM C M, GUDMESTAD N C. Shift in sensitivity of *Alternaria solani* in response to QoI fungicides[J]. *Plant Dis*, 2004, 88(2): 181-187.
- [9] ARREAZA J M, HERNANDEZ L. Evaluation of azoxystrobin on the early blight control (*Alternaria solani*) in tomatoes[J]. *Revista De La Facultad De Agronomia De La Universidad Del Zulia*, 2001, 18(2): 106-116.
- [10] MA Z H, FELTS D, MICHAILIDES T J. Resistance to azoxystrobin in *Alternaria* isolates from pistachio in California[J]. *Pestic Biochem Physiol*, 2003, 77(2): 66-74.
- [11] MA Z H, MICHAILIDES T J. An allele-specific PCR assay for detecting azoxystrobin-resistant *Alternaria* isolates from pistachio in California[J]. *J Phytopathol*, 2004, 152(2): 118-121.
- [12] BRANDT U, SCHÄGGER H, JAGOW G V. Characterisation of binding of the methoxyacrylate inhibitors to mitochondrial cytochrome c reductase[J]. *Eur J Biochem*, 1988, 173(3): 499-506.
- [13] HELLWIG V, DASENBROCK J, KLOSTERMEYER D, et al. New benzodioxepin type strobilurins from *Basidiomycetes* structural revision and determination of the absolute configuration of strobilurin D and related β -methoxyacrylate antibiotics[J]. *Tetrahedron*, 1999, 55(33): 10101-10118.
- [14] BECKER W F, VON JAGOW G, ANKE T, et al. Oudemansin, strobilurin A, strobilurin B and myxothiazol: new inhibitors of the bc 1 segment of the respiratory chain with an E- β -methoxyacrylate system as common structural element[J]. *FEBS Lett*, 1981, 132(2): 329-333.
- [15] BRENT K J, HOLLOMON D W. Fungicide resistance: the assessment of risk[M]. FRAC Monograph No. 2, Global Crop Protection Federation, Brussels, 1998: 48.
- [16] LU Y L, SUTTON T B, YPEMA, H. Sensitivity of *Alternaria mali* from North Carolina apple orchards to pyraclostrobin and boscalid[J]. *Phytopathology*, 2003, 93: S54(Abstract).
- [17] PASCHE J S, PICHE L M, GUDMESTAD N C. Effect of the F129L

- mutation in *Alternaria solani* on fungicides affecting mitochondrial respiration[J]. *Plant Dis*, 2005, 89(3): 269-278.
- [18] 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.
- [19] 黄艳飞, 陈庆园, 王进, 等. 线粒体旁路氧化途径抑制剂水杨脲酸 (SHAM) 协同下烟草赤星病菌对啞菌酯的敏感性[J]. *中国烟草学报*, 2015, 21(6): 65-70.
HUANG Y F, CHEN Q Y, WANG J, et al. Sensitivity of *Alternaria alternata* to azoxystrobin at the synergism of alternative oxidative inhibitor salicylhydroxamic acid[J]. *Acta Tabacaria Sinica*, 2015, 21(6): 65-70.
- [20] 周杰敏, 任璐, 刘慧平, 等. 番茄早疫病菌对啞菌酯的抗药性诱导及突变体特性研究[J]. *山西农业大学学报(自然科学版)*, 2010, 30(1): 19-23.
ZHOU J M, REN L, LIU H P, et al. Resistant inducing of *Alternaria solani* to azoxystrobin and determination of mutant characteristics[J]. *J Shanxi Agric Univ Nat Sci Ed*, 2010, 30(1): 19-23.
- [21] CATEN C E, JINKS J L. Spontaneous variability of single isolates of *Phytophthora infestans* I. Cultural variation[J]. *Can J Bot*, 1968, 46(4): 329-348.
- [22] 汪汉成, 周浩, 张之砚, 等. 烟草灰霉病菌啞菌酯抗药性突变菌株的诱导及其生物学特性分析[J]. *中国烟草学报*, 2018, 24(3): 82-87.
WANG H C, ZHOU H, ZHANG Z F, et al. Induction and biological characters of laboratory mutants of *Botrytis cinerea* resistant to azoxystrobin[J]. *Acta Tabacaria Sinica*, 2018, 24(3): 82-87.
- [23] WANG H C, SUN H Y, STAMMLER G, et al. Generation and characterization of isolates of *Peronophythora litchi* resistant to carboxylic acid amide fungicides[J]. *Phytopathology*, 2010, 100: 522-527.
- [24] WANG H C, HUANG Y F, TANG X G, et al. Leaf and stem rot of tobacco (*Nicotiana tabacum*) caused by *Rhizopus oryzae* in closed curing barns in Guizhou Province of China[J]. *Plant Dis*, 2016, 100(2): 536.
- [25] WANG H C, WANG M S, XIA H Q, et al. First report of Fusarium wilt of tobacco caused by *Fusarium kyushuense* in China[J]. *Plant Dis*, 2013, 97(3): 424.
- [26] 张佳, 张璨, 芦帆, 等. 草莓灰霉病菌对啞菌酯的抗性检测及抗性菌株的生物学特性研究[J]. *植物病理学报*, 2016, 46(1): 124-130.
ZHANG J, ZHANG C, LU F, et al. Detection of resistance to azoxystrobin and characterization of the azoxystrobin-resistant isolates in *Botrytis cinerea* from strawberry[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2016, 46(1): 124-130.
- [27] 程玉峰. 马铃薯晚疫病病菌对啞菌酯的抗性风险评估及抗性分子机制研究 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2008: 25-26.
CHENG Y F. Assessment of the risk of *Phytophthora infestans* resistant to azoxystrobin and the molecular mechanism of resistance[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2008: 25-26.
- [28] 孟润杰, 韩秀英, 吴杰, 等. 河北省黄瓜霜霉病菌对甲霜灵和啞菌酯的抗性动态及七种药剂的田间防效[J]. *植物保护学报*, 2017, 44(5): 849-855.
MENG R J, HAN X Y, WU J, et al. Resistance dynamics of *Pseudoperonospora cubensis* to metalaxyl and azoxystrobin and control efficacy of seven fungicides against cucumber downy mildew in Hebei Province[J]. *Plant Prot*, 2017, 44(5): 849-855.
- [29] GISI U, SIEROTZKI H, COOK A, et al. Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides[J]. *Pest Manag Sci*, 2002, 58: 850-867.

(责任编辑: 唐 静)