

川渝地区油菜菌核病菌对多菌灵的 抗性监测及抗性机理研究^①

乔 昕, 余 洋, 陈 杰,
杨宇衡, 谭万忠, 毕朝位

西南大学 植物保护学院, 重庆 400715

摘要: 油菜菌核病是危害油菜生产的主要病害, 多菌灵作为防治该病害的有效杀菌剂在很多地区已产生抗性. 川渝地区是我国油菜的重要产区, 油菜菌核病发生普遍, 但该地区病原菌对多菌灵抗性研究未见报道. 该文开展川渝地区油菜菌核病对多菌灵敏感性基线、抗性监测及抗性分子机理的研究, 采用菌丝生长速率法测定了 106 个野生菌株对多菌灵的敏感性, 结果表明病原菌 EC_{50} 值在 $0.009\ 12\sim 0.182\ 7\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 之间, 不同敏感性的菌株频率呈近连续的单峰曲线分布, 平均 EC_{50} 值为 $(0.067\ 25\pm 0.034\ 06)\ \mu\text{g}/\text{mL}$; 以 $5.0\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 作为田间抗性菌株的区分剂量, 检测了 2013 年采自该地区 10 个区、县、市 585 株病原菌对多菌灵的抗性, 结果表明绝大多数为敏感菌株, 占 99.49%, 仅发现 3 株田间抗性菌株, 占 0.51%; 3 株抗性菌株的抗性倍数达 2 085 倍以上, 均为高抗菌株; 以引物 BI-1/B3-1 PCR 扩增抗性菌株的 β -微管蛋白基因, 测序并与标准菌株 1 980 比对, 结果发现 3 株抗性菌株的 198 位氨基酸均由 Glu 变为 Ala.

关键词: 油菜菌核病; 多菌灵; 敏感性基线; 抗药性; 抗性机理

中图分类号: S436.341.1

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2016)05-0026-05

油菜菌核病是世界范围内油菜生产的主要病害, 俗称烂秆、白秆、霉蔸等, 主要危害油菜茎秆, 引起植株早枯, 果荚减少, 种子皱缩, 导致干粒质量和出油率降低而造成减产^[1]. 我国最早的油菜菌核病报道于 1932 年, 该病害由病原菌 *Sclerotinia sclerotiorum* 引起^[2-3]. 我国大部分地区多年来一直使用多菌灵(carbendazim)为代表的苯并咪唑类杀菌剂防治该病害, 这类药剂的作用机制是通过与菌体的微管蛋白结合, 影响与微管蛋白有关的代谢和功能, 如纺锤丝形成、细胞核分裂等, 阻止菌丝正常形成以达到灭菌目的^[4-6]. 但也因其作用位点单一, 长期连续大面积单一使用, 加速了病原菌对多菌灵产生抗药性. 潘以楼等^[7]于 1995 年在江苏句容首次检测到田间抗多菌灵的油菜菌核病菌株, 随后连续多年的监测结果表明产生抗性的范围增大, 抗性菌株比例呈上升趋势, 并且抗性水平很高, 达到高抗水平^[8]. 李红霞等^[9]于 2002 年首先用 PCR 法扩增出油菜菌核病菌 β -微管蛋白基因序列片段, 发现多菌灵抗性菌株与敏感菌株的 β -微管蛋白基因 198 位密码子发生碱基突变, 由 GAG 突变为 GCG, 致使突变菌株表现高水平抗性. 杨敬辉等^[10]于 2004 年发现, 油菜菌核病对多菌灵抗性水平的高低与 β -微管蛋白中基因突变位点的位置有关. 对其他病原菌的研究结果表明, 植物病原真菌田间抗性菌株的突变大多发生于 β -微管蛋白的 67, 198, 200, 240 位氨基酸, 而室内诱导抗性菌株的突变还可以位于 134, 165, 241, 257 等氨基酸密码子上^[11].

① 收稿日期: 2014-08-29

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201303023); 重庆市自然科学基金(CSTC202jjA80035); 中央高校基本科研业务费专项(XDJK2013B042).

作者简介: 乔 昕(1989-), 男, 山西太原人, 硕士研究生, 主要从事杀菌剂研究.

通信作者: 毕朝位, 副教授.

为了了解目前川渝地区油菜主产区油菜菌核病菌对多菌灵的抗药性现状,本研究通过对川渝各地油菜菌核病菌的抗药性监测,为指导油菜菌核病的防治、田间病菌抗药性风险评估及监测治理提供有价值的理论和实践依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试菌株

2013 年,在四川省和重庆市油菜种植的主要县区随机采集病株上的菌核。在发病植物茎秆中收集菌核,一株发病茎秆作为一个菌株,共收集得到 585 株油菜菌核病菌株。

1.1.2 供试药剂

98%多菌灵原药(江苏镇江农药厂),预溶于 0.2 mol/L 盐酸中,最终配成 10 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的母液备用;引物 B1-1\B3-1 由上海生工公司合成;大肠杆菌菌株、Taq 酶以及相应试剂购于天根生化科技(北京)有限公司;pMD18-T 载体购于 TaKaRa 公司。

1.1.3 培养基

PDA(Potato-Dextrose-Agrose)培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂粉 17 g,蒸馏水 1 000 mL。

1.2 实验方法

1.2.1 油菜菌核病菌对多菌灵敏感性基线的建立

采用菌丝生长速率法测定油菜菌核病菌对多菌灵的敏感性基线^[12-13]。选取未施药田块的病秆(其中阆中 17 株、宜宾 10 株、武胜 10 株、岳池 12 株、隆昌 13 株、威远 12 株、永川 9 株、潼南 9 株、丰都 7 株、北碚 7 株),取 1 粒菌核均等切成小块,经 0.1%升汞表面消毒,在 PDA 培养基平板上 20 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 d,纯化后保存。将菌株 20 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 d 取菌落边缘制成直径 7 mm 的菌碟,将其接种在含多菌灵为 0,0.005,0.01,0.05,0.1,0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PDA 培养基平板上,20 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 d,十字交叉法测量菌落直径,每处理重复 3 次,分别计算病菌对多菌灵剂量反应曲线的毒力回归方程及 EC_{50} 值。

1.2.2 油菜菌核病菌对多菌灵的田间抗性监测

采用区分剂量法测定油菜菌核病菌对多菌灵的敏感性^[14]。以 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 为鉴定敏感、抗性菌株标准,即在 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 多菌灵培养基上能正常生长的为抗性菌株,不能生长的为敏感性菌株。

取 1 粒菌核均等切成若干小块,经 0.1%升汞表面消毒,置于含 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 多菌灵的 PDA 培养基平板,以不加药的 PDA 培养基平板为对照,20 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2~3 d,每处理重复 3 次。统计各地的抗性菌株个数、计算抗性频率。

$$\text{抗性频率} = \frac{\text{抗性菌株个数}}{\text{总测定菌株个数}} \times 100\%$$

1.2.3 田间抗性菌株的抗性水平测定

将检测到的抗性菌株,在 PDA 培养基平板上 20 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 d,在菌落边缘打孔制成直径为 7 mm 的菌碟,将其接种在含多菌灵为 0,5,10,50,100,200,400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PDA 培养基平板上。20 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 d,十字交叉法测量菌落直径,每处理重复 3 次。分别计算抗性菌株对多菌灵剂量反应曲线的毒力回归方程及 EC_{50} 值,以抗性菌株的 EC_{50} 值与敏感性基线的比值计算抗性倍数。同时以菌株的 EC_{50} 值为标准划分菌株的抗性标准^[15],即 1 $\mu\text{g}/\text{mL} < EC_{50} < 10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的菌株为低抗,10 $\mu\text{g}/\text{mL} < EC_{50} < 100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的为中抗, $EC_{50} > 100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的为高抗。

1.2.4 田间抗性菌株 β -微管蛋白基因的克隆与测序

油菜菌核病菌总 DNA 的提取采用 CTAB 提取法^[16-18]。

PCR 引物 B1-1 和 B3-1 序列分别为

B1-1: 5'-GGTTTCCAAATCACCCACTCTCTCG-3'

B3-1: 5'-GAACTCCATCTCGTCCATACCCTCA-3'。

PCR 反应体系: 0.5 μL Taq DNA 聚合酶(2.5 U/ μL)、2.5 μL 10 $\times$ buffer、1.5 μL Mg^{2+} (25 mmol/L)、2 μL dNTP(2.5 mmol/L each)、0.5 μL B1-1(5 mol/L)、0.5 μL B3-1(5 mol/L)、0.5 μL DNA 模板(10 ng),加水至 25 μL 。

PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min,63 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 30 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。

PCR 产物胶回收, 连接至 pMD18-T 载体上, 转化大肠杆菌, 挑选阳性克隆进行测序。序列测定由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。

利用 Danman 6.0 软件分析测序结果, 并利用多重序列比对抗药性菌株和标准油菜菌核病菌株 1 980 的 β -微管蛋白基因碱基序列及编码的氨基酸序列差异。

2 结果与分析

2.1 油菜菌核病菌对多菌灵的敏感性基线

采用菌丝生长速率测定法测定了从四川、重庆各地采集分离的 106 株油菜菌核病菌菌株对多菌灵的敏感性, 它们的敏感性分布如图 1, EC_{50} 值变化范围为 0.009 12~0.182 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 最不敏感菌株的 EC_{50} 值是最敏感菌株的 20 倍, 平均 EC_{50} 值为(0.067 25 $\pm$ 0.034 06) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。106 株油菜菌核病菌对多菌灵的敏感性频率分布呈连续单峰曲线, 接近正态分布, 没有出现敏感性下降的抗药性群体, 这些病菌均为多菌灵野生敏感菌株, 因此可以采用这些菌株的 EC_{50} 值作为油菜菌核病菌对多菌灵的敏感性基线。

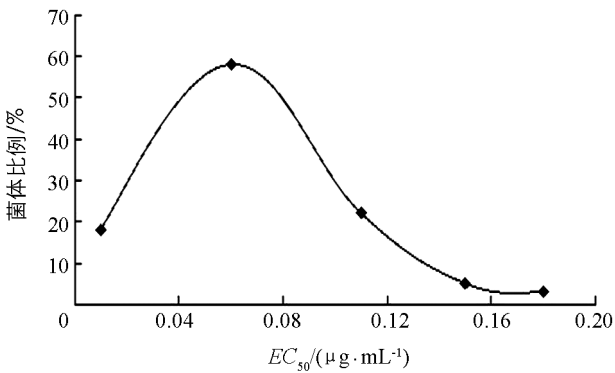


图 1 108 株油菜菌核病对多菌灵的敏感性频率分布

2.2 油菜菌核病菌对多菌灵的田间抗性监测

由表 1 可见, 从四川省、重庆市共 10 个区县采集油菜菌核病病秆, 以药剂质量浓度 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作为鉴别剂量, 测定了 585 株病原菌对多菌灵的田间抗性。结果表明, 仅有 3 株多菌灵田间抗性菌株, 抗性频率分别为 0.51%, 说明本地区油菜菌核病菌对多菌灵仍以敏感性菌株为主, 但是仍然存在抗性菌株, 因此今后川渝地区油菜菌核病对多菌灵的田间抗性监测依然重要。

表 1 川渝地区菌核病病菌对多菌灵的抗性频率

采集地	菌株数	抗性菌株数	抗性频率/%	采集地	菌株数	抗性菌株数	抗性频率/%
四川阆中	124	1	0.81	重庆永川	51	0	0
四川宜宾	40	0	0	重庆潼南	42	0	0
四川武胜	42	0	0	重庆丰都	41	0	0
四川岳池	39	0	0	重庆北碚	39	0	0
四川隆昌	98	0	0	合计	585	3	0.51
四川威远	69	2	2.90				

2.3 田间抗性菌株的抗性水平

采用菌丝生长速率测定法测定 3 株抗性菌株, 结果表明 3 株多菌灵田间抗性菌株 EC_{50} 值分别为 5095.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 140.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 254.48 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 抗性倍数分别为 75 765 倍、2 085 倍、3 784 倍(表 2), 以抗性的标准划分, 3 株田间抗性菌株均为高抗。

表 2 油菜菌核病菌对多菌灵抗性菌株的毒力测定

菌 株	毒力回归方程	$EC_{50}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	R	抗性倍数
LZDR9-13	$y=0.321x+3.810$	5 095.25	0.991	75 765
WYDR75	$y=0.318x+4.235$	140.25	0.984	2 085
WYDR54	$y=0.388x+4.167$	254.48	0.981	3 784

2.4 田间抗性菌株的抗性分子机理

利用引物 B1-1 和 B3-1 对 3 个抗药性菌株的 β -微管蛋白基因进行 PCR 扩增, 均获得相同长度的 DNA 片段, 双向测序确定上述 3 个油菜菌核病菌菌株的 β -微管蛋白基因片段长度为 841 bp, 与标准菌株 1 980 的 β -微管蛋白基因序列比较, 发现第 593 位碱基 A 变成 C, 相应的 198 位氨基酸由谷氨酸 Glu 变成丙氨酸 Ala, 其他位点未发生变异, 即表明 3 株油菜菌核病菌田间多菌灵抗性菌株的抗性是由该位点的氨基酸突变引起的。

3 讨 论

多菌灵属于苯并咪唑类杀菌剂, 因其杀菌谱广, 内吸性强, 防病效果好, 自 20 世纪 70 年代以来代替有机汞、有机硫杀菌剂广泛应用于防治油菜菌核病和小麦赤霉病等多种作物病害, 对促进粮、棉、油、菜、果的稳产高产发挥了重要作用。但是由于其作用位点单一, 广泛使用后容易使病原菌对其产生抗药性, 如苹果轮纹病菌^[19]、芒果炭疽病菌^[20]、黄瓜黑星病菌^[21]等, 都发现对多菌灵产生抗性。目前已报道对多菌灵产生抗药性的主要油菜产区大多数分布在江苏省范围内。本研究结果表明, 在四川省及重庆市的油菜生产区, 油菜菌核病菌对多菌灵仍以敏感性菌株为主, 这可能和川渝地区对油菜菌核病的防治习惯有关。虽然有油菜菌核病发生, 但是由于相对整体油菜种植数量, 发病程度低, 发生地点相对零散, 对最终菜籽的产量和品质没有太多的影响, 因此近些年并没有采用大规模, 长时间的传统药剂防治, 田间仍以敏感性菌株为主。在实际生产中, 当油菜菌核病大规模发生时, 可以利用多菌灵进行防治, 但是仍有抗性菌株发现, 并且都为多菌灵高抗菌株, 这也许和油菜菌核病基因自然突变有关, 虽然突变率极低, 但是由于种群数量巨大, 仍然存在不通过人为药剂驯化和长时间药剂施用产生抗性菌株的可能性, 因此在实际多菌灵的应用中, 对多菌灵抗性的检测仍然重要。并且在实际操作中, 要尽量避免具有已知交互抗性的药剂长时间使用, 例如苯菌灵、甲基托布津等。

大量研究结果表明植物病原真菌田间抗性菌株的突变发生于 β -微管蛋白 167, 198, 200, 240 等氨基酸, 室内诱导抗性菌株的突变还可以位于 134, 165, 241, 257 等氨基酸密码子上, 而 β -微管蛋白 198 位或者 200 位氨基酸与抗性高低有关。本研究获得了油菜菌核病菌 β -微管蛋白部分基因序列及相应的氨基酸序列。序列分析得知 198 位氨基酸由 Glu(MBC^S) 变为 Ala(MBC^R), 与有关田间抗苯并咪唑类菌株的突变位点发生在 198 位氨基酸上的报道一致, 并且经过多菌灵对抗性油菜菌核病菌菌株毒力测定表明, 198 位氨基酸由 Glu(MBC^S) 变为 Ala(MBC^R) 抗性菌株为高抗菌株, 与前人报道一致。

参考文献:

- [1] 张建忠, 邵兴华, 肖红艳. 油菜菌核病的发生与防治研究进展 [J]. 南方农业学报, 2012, 43(4): 467—471.
- [2] 李丽丽. 世界油菜病害研究概述 [J]. 中国油料, 1994, 16(1): 79—81.
- [3] ADAM P B, AYERS W A. Ecology of *Sclerotinia* Species [J]. Phytopathology, 1979(69): 896—899.
- [4] 徐文杰. 油菜菌核病菌对多菌灵的抗药性研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2011.
- [5] HARRIE K, SHAUNA C, SOMERVILLE, A, et al. Characterization of Mutation in the Beta-Tubulin Gene of Benomyl-Resistant Field Strains of *Venturia inaequalis* and Other Plant Pathogenic Fungi [J]. Molecular Plant Pathology, 1992, 82(11): 1348—1354.
- [6] MAKOTO F, KENJI O, HIROKAZU I. A Single Amino-Acid Substitution in the Beta-Tubulin Gene of *Neurospora* Confers Both Carbendazim Resistance and Diethofencarb Sensitivity [J]. Current Genetics, 1992, 21(4): 399—404.
- [7] 潘以楼, 汪智渊, 吴汉章. 油菜菌核病菌对多菌灵的抗药性 [J]. 中国油料, 1997, 13(3): 67—69.
- [8] 石志琦, 周明国, 叶钟音. 油菜菌核病菌对多菌灵的抗药性监测 [J]. 江苏农业学报, 2000, 16(4): 226—229.
- [9] 李红霞, 周明国, 陆悦健. 应用 PCR 方法检测油菜菌核病对多菌灵的抗药性 [J]. 菌物系统, 2002, 21(3): 370—374.
- [10] 杨敬辉, 潘以楼, 朱桂梅, 等. 油菜菌核病菌对多菌灵和乙霉威的抗药性机理 [J]. 植物保护学报, 2004, 31(1): 74—77.
- [11] 李红霞. 四种植物病原真菌对多菌灵的抗药性分子遗传机制及其检测技术的研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2003.
- [12] 陈功友. 苹果炭疽病菌对多菌灵抗药性研究 [J]. 果树科学, 1993, 10(3): 150—153.
- [13] 王 翀. 戊唑醇对油菜菌核病菌作用机制的研究 [J]. 中国油料作物学报, 2010, 32(3): 436—440.
- [14] 匡 静, 王建新, 周明国. 江苏省油菜菌核病菌对多菌灵和菌核净的抗药性监测 [J]. 中国农学通报, 2011, 27(15):

285—291.

- [15] 王 真. 几种植物病原菌对杀菌剂的抗药性研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2009.
- [16] 杨艳秋. 病原真菌 DNA 提取方法及简单重复序列聚合酶链反应体系的优化 [J]. 中国纺织工程研究与临床康复, 2009, 13(50): 9925—9927.
- [17] 陆悦健, 周明国, 叶钟音. 水稻恶苗病菌对苯并咪唑类杀菌剂抗药性分子机理研究初探 [J]. 菌物系统, 1997, 16(3): 235—240.
- [18] 李红霞, 陆悦健, 周明国, 等. 油菜菌核病菌 β -微管蛋白基因与多菌灵抗药性相关突变的研究 [J]. 中国油料作物学报, 2003, 25(2): 56—60.
- [19] 马志强, 李红霞, 袁章虎, 等. 苹果轮纹病菌对多菌灵抗药性监测初报 [J]. 农药学报, 2000, 9(3): 94—96.
- [20] 詹儒林, 郑服丛. 芒果炭疽病菌 β -微管蛋白基因的克隆及其与多菌灵抗药性发生的关系 [J]. 微生物学报, 2004, 44(6): 827—829.
- [21] 潘洪玉, 张 浩, 丁 利, 等. 黄瓜黑星病菌对多菌灵抗药性的测定 [J]. 植物保护学报, 1997, 24(3): 285—286.

Molecular Mechanism and Monitoring on Carbendazim Resistance of *Sclerotinia sclerotiorum* Obtained from the Blight Stems of Rape in Chongqing and Sichuan

QIAO Xin, YU Yang, CHEN Jie,
YANG Yu-heng, TAN Wan-zhong, BI Chao-wei

School of Plant Protection, Southwest University, Chongqing, China 400715

Abstract: *Sclerotinia sclerotiorum* is the main rape disease in the world, which should do harm to the production of the rape. Carbendazim (MBC) was widely used to control sclerotinia stem rot in a long time, but development of MBC resistance in the causal agent *S. sclerotiorum* led to control failures of this disease. In Sichuan Province and Chongqing, southwest China, where is an important oilseed rape, *S. sclerotiorum* occurs widespreadly, and some places are seriously. But field-resistance strains are not reported in recent years. So in this study, the sensitivity baseline of the pathogen to MBC was established, and resistance monitoring and molecular mechanism were also studied. There are main results as follow: the sensitivity to MBC of 108 wild strains of *S. sclerotiorum* were collected from the area without fungicides prevention, tested by mycelium growth rate method. The results demonstrated that the sensitivity baseline of the pathogen to MBC is $(0.067\ 25 \pm 0.034\ 06)\ \mu\text{g/mL}$. Based on the discriminatory concentration in PDA amended with MBC of $5\ \mu\text{g/mL}$, a total of 585 single-sclerotium isolates (the 10 counties) of *S. sclerotiorum* were collected to monitor resistance. The result shows that the vast majority of strains are sensitive strains, accounting for 99.49%. Only 3 field-resistance strains are found, accounting for 0.51%. The EC_{50} values of three resistance strains are $5\ 095.25\ \mu\text{g/mL}$, $140.25\ \mu\text{g/mL}$, $254.48\ \mu\text{g/mL}$, and the resistance multiples are 75 765 times, 2 085 times, 3 784 times. All of them belonged to high resistance strains. Amplified the resistance strains' β -tubulin gene by PCR, the results was sequenced and compared with strain 1980. The study shows that a single mutation resulting in the replacement of GAG(Glu) by GCG(Ala) at the 198th amino acide caused the high resistance to carbendazim.

Key words: *Sclerotinia sclerotiorum*; carbendazim; sensitivity baseline; resistance; molecular mechanism

