

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2025.04.009

刘梦晴, 屠紫娟, 余洋, 等. 灰葡萄孢菌对二甲酰亚胺类杀菌剂抗性的 AS-PCR 快速检测技术 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2025, 47(4): 101-112.

# 灰葡萄孢菌对二甲酰亚胺类杀菌剂抗性的 AS-PCR 快速检测技术

刘梦晴<sup>1,2</sup>, 屠紫娟<sup>1,2</sup>, 余洋<sup>1,2</sup>, 杨宇衡<sup>1,2</sup>,  
方安菲<sup>1,2</sup>, 田斌年<sup>1,2</sup>, 王静<sup>1,2</sup>, 毕朝位<sup>1,2</sup>

1. 西南大学 宜宾研究院, 四川 宜宾 644000; 2. 西南大学 植物保护学院, 重庆 400715

**摘要:** 灰霉病是一种由灰葡萄孢菌引起、果蔬上常见的真菌病害, 其发生对农业生产造成巨大损失。由于二甲酰亚胺类杀菌剂(DCFs)的广泛使用, 灰葡萄孢菌对其已经产生了抗药性, 为快速检测灰葡萄孢菌对 DCFs 抗性, 基于灰葡萄孢菌 *BOS1* 基因的点突变 I365S 和 I365N, 建立了一种灰葡萄孢菌对 DCFs 抗性的等位基因特异性 PCR (AS-PCR) 快速分子检测方法。首先, 以 *BOS1* 基因为靶序列设计特异性引物, 然后对 PCR 体系的退火温度、内参引物与特异性引物浓度配比进行优化, 并对引物灵敏度和特异性进行评价, 最后利用快速抽提法提取田间病原菌 DNA 进行抗药性检测。结果表明: 正向特异性引物 I365S-7F、I365S-8F 和 I365N-8F 分别与引物 I365-R 结合组成的引物对可以检测出 I365S 和 I365N 抗性菌株, 最适退火温度分别为 57 °C、58 °C 和 58 °C; 内参引物与特异性引物浓度比例为 1:2, 其灵敏度分别为 7 ng/μL、70 ng/μL 和 70 ng/μL, 并具有特异性; 利用 NaOH 裂解法快速提取田间菌株 DNA 进行抗药性检测, 其结果与测序结果一致。以上结果说明该 AS-PCR 技术具有特异性强、操作简单等优势, 可为田间灰葡萄孢菌对 DCFs 类抗性菌株的快速检测提供一种较为可行的方法。

**关键词:** 灰葡萄孢菌; 二甲酰亚胺类杀菌剂;

等位基因特异性 PCR; 抗药性

中图分类号: S436.631

文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



文章编号: 1673-9868(2025)04-0101-12

## Rapid Detection of the Resistance of *Botrytis cinerea* to Dicarboximide Fungicides by AS-PCR

LIU Mengqing<sup>1,2</sup>, TU Zijuan<sup>1,2</sup>, YU Yang<sup>1,2</sup>, YANG Yuheng<sup>1,2</sup>,  
FANG Anfei<sup>1,2</sup>, TIAN Binnian<sup>1,2</sup>, WANG Jing<sup>1,2</sup>, BI Chaowei<sup>1,2</sup>

收稿日期: 2024-10-17

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFD1400901); 四川省宜宾市双城协议保障科研经费项目(XNDX2022020011); 国家自然科学基金项目(31871990)。

作者简介: 刘梦晴, 硕士研究生, 主要从事杀菌剂方面的研究。

通信作者: 毕朝位, 副教授。

1. Yibin Academy of Southwest University, Yibin Sichuan 644000, China;
2. College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400715, China

**Abstract:** Gray mold is a common fungal disease in fruits and vegetables caused by *Botrytis cinerea*, which causes great losses to agricultural production. Due to the widespread use of dicarboximide fungicides (DCFs), *B. cinerea* has developed resistance to this fungicide. In order to rapidly detect resistance of *B. cinerea* to DCFs, we developed an allele-specific PCR (AS-PCR) rapid molecular detection method for the resistance of *B. cinerea* to DCFs based on the point mutations I365S and I365N of *BOS1* gene. First, we designed specific primers with *BOS1* gene as the target sequence, then optimized the base mismatch, annealing temperature, the concentration ratio of internal reference primers and specific primers of PCR system, and evaluated the specificity and sensitivity of primers. Finally, we used rapid extraction method to extract DNA from field samples for detection and application. The results showed that the primer pairs composed of the forward specific primers I365S-7F, I365S-8F and I365N-8F respectively with reverse primer I365-R could distinguish the resistant and sensitive strains of I365S and I365N mutation, and the optimal annealing temperatures was 57 °C, 58 °C and 58 °C, respectively. The concentration ratio of internal reference primers and specific primers was 1 : 2, the sensitivities were 7 ng/ $\mu$ L, 70 ng/ $\mu$ L and 70 ng/ $\mu$ L, respectively, and the amplifications were specific. The results of PCR detection with DNA extracted from field strains by NaOH lysis method were consistent with the sequencing results. In conclusion, AS-PCR technology has the advantages of strong specificity and simple operation, which provides a feasible and rapid detection method for monitoring the resistance of gray mold to DCFs kind of fungicides.

**Key words:** *Botrytis cinerea*; dicarboximide fungicides; allele-specific PCR; drug resistance

灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)是一种典型的死体营养型病原菌,引起的灰霉病是一种具有毁灭性的真菌病害,其产孢量大、寄主范围广泛,植物整个生育期皆可发病,低温高湿条件下灰霉病加重,可引起作物腐烂或幼苗死亡,严重威胁果蔬等重要经济作物的产量和质量<sup>[1-2]</sup>。

目前防治灰霉病主要以化学防治为主,常用的杀菌剂有苯并咪唑类、二甲酰亚胺类、苯胺基嘧啶类、苯吡咯类、琥珀酸脱氢酶抑制剂类等<sup>[3-4]</sup>。由于灰葡萄孢菌具有寄主范围广、繁殖速度快、遗传变异强以及寄生适合度高等特点,导致其在过去几十年大量用药情况下对多种作用机制的杀菌剂均产生了严重的抗性,增加了抗药性的风险<sup>[5]</sup>。

1967年由日本公司研究发现二甲酰亚胺类杀菌剂(Dicarboximide Fungicides, DCFs)对灰葡萄孢菌具有良好的防治效果<sup>[6]</sup>,并在20世纪70年代首次引入中国市场<sup>[7]</sup>,主要包括异菌脲、腐霉利和乙烯菌核利等。但随着该类药剂的广泛使用,灰葡萄孢菌对其抗性日益严重。据报道,1979年德国和法国分别有近80%和60%的灰葡萄孢菌对该类药剂产生抗性;2021年,巴西灰葡萄孢菌对异菌脲的抗性达到44%<sup>[8]</sup>。在中国各地都检测到了高频的DCFs抗性菌株<sup>[9-10]</sup>,2013年宋晰等<sup>[9]</sup>研究表明在内蒙古、辽宁等地采集的灰葡萄孢菌对腐霉利的平均抗性频率均高达90%以上;2018年,杜颖<sup>[10]</sup>发现辽宁对腐霉利抗性达到94%以上;2021年,四川灰葡萄孢菌对腐霉利抗性频率达80%<sup>[11]</sup>;2022年,江苏灰葡萄孢菌对异菌脲抗性频率达51.44%<sup>[12]</sup>。

该类药剂抗性机理可能是通过过度激活相关信号的传导途径造成甘油等渗透压稳定剂在菌体内大量积

累,从而导致外部水的大量涌入造成细胞膨胀后死亡<sup>[13]</sup>。植物病原真菌抗药性的产生大多是由特定基因的单核苷酸突变导致<sup>[14-15]</sup>。Orth等<sup>[16]</sup>认为 DCFs 抗性是由单基因控制的,其靶标位点可能与双组份组氨酸激酶(TCHK)有关,真菌中双组份组氨酸激酶通常由5~6个重复 HAMP 区域、HisKA、HATPase、REC等结构域组成,但该类药剂与靶标位点的精确作用机理尚不明确<sup>[17-19]</sup>。灰葡萄孢菌双组份组氨酸激酶信号途径中包括双组份组氨酸激酶 BOS1、反应调控蛋白 BRRG-1、促分裂原活化蛋白激酶(Mitogen-activated-ProteinKinase, MAPK)BOS2 和 MAPK 的激酶 BOS4、BOS5 等重要元件,但仅双组份组氨酸激酶 BOS1 对 DCFs 抗性起作用<sup>[20]</sup>。目前,很多研究者认为双组份组氨酸激酶 BOS1 基因保守区域 HAMP 点突变导致灰葡萄孢对该类杀菌剂抗性的产生。通过对比不同国家中采集的灰葡萄孢菌 DCFs 抗性和敏感菌株的 DNA 序列,发现抗性菌株中分别存在 BOS1 基因 365 位或 369 位氨基酸替换<sup>[21-22]</sup>; Banno 等<sup>[23]</sup>和 Ma 等<sup>[24]</sup>研究者也表明 BOS1 上 I365SV、V368F、Q360P 和 Q396H 点突变与 DCFs 抗性有关。除该基因点突变外,其他抗性机制也可能会导致抗药性产生(如链格孢菌<sup>[25]</sup>),但这种机制目前还未在灰葡萄孢菌中有相关报道。现已报道的 BOS1 上存在的点突变有 I365N/R/S、Q369P/H、V368F、N373S 和 T447S 等,其中 365、369、373 位氨基酸的突变最为常见,这些突变会使 HAMP 区域的空间构象发生改变从而导致灰霉病菌对 DCFs 产生不同水平的抗性<sup>[26-27]</sup>。研究结果显示,重庆地区灰葡萄孢菌对 DCFs 抗性 BOS1<sup>I365S</sup>、BOS1<sup>I365N</sup> 点突变占主导地位,比例分别为 37.5%和 52.1%<sup>[28]</sup>。

及时了解 and 发现地区抗药性发展情况,可根据结果更改用药策略,因此掌握病原菌抗药性的快速检测方法也显得尤为重要。检测杀菌剂抗性的传统方法包括菌落直径法、孢子萌发法、抑菌圈法和最低浓度抑制法等<sup>[29-34]</sup>,但此类方法检测周期长、操作繁琐、效率低。分子检测方法具有简单、快速和通量高等优点。等位基因特异性 PCR(Amplification Refractory Mutation System PCR, AS-PCR)就是一种高通量检测单核苷酸突变的分子技术,该方法操作简单、特异性强、成本相对较低,只需要 PCR 仪和琼脂凝胶电泳即可完成检测。如 Ma 等<sup>[35]</sup>、罗梅等<sup>[36]</sup>和郭东锋等<sup>[37]</sup>利用 AS-PCR 技术分别成功检测了白僵菌对苯并咪唑类杀菌剂、桃褐腐病菌对多菌灵以及马铃薯晚疫病病菌对甲霜灵的抗性菌株。本研究基于灰葡萄孢菌 DCFs 抗性突变靶标 BOS1 基因 I365S 和 I365N 点突变,建立了能快速检测抗性菌株的 AS-PCR 技术并将其初步应用于田间抗性监测,旨在实践中对灰葡萄孢菌 DCFs 抗性群体进行动态监测。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株

灰葡萄孢菌 BOS1<sup>I365S</sup> 点突变菌株 CS3、CS8、H9 和 XM9, BOS1<sup>I365N</sup> 点突变菌株 B1、B31、B32 和 XM5,敏感菌株 B05.10、C25、lp1 和 H4;小麦赤霉病菌、高粱炭疽病菌、稻瘟病菌、稻曲病菌、核盘菌和木霉菌。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 AS-PCR 引物设计

从 NCBI 网站下载二甲酰亚胺类杀菌剂作用靶标双组份组氨酸激酶的编码基因 BOS1 (序列号:AF396827.2),并根据抗性菌株 BOS1 基因 HAMP 区域点突变 I365S 和 I365N(突变位置见图 1),同时借助于软件 primer premier 5.0 完成引物设计,对相应的突变方式分别设计相应的正向特异性引物,将突变位点设计在正向引物的 3' 末端,且在突变点前后 1~2 个碱基设计错配进而提高引物的特异性,引物序列如表 1、表 2。以 CTAB 法<sup>[38]</sup>提取的灰葡萄孢敏感菌株和抗性菌株 DNA 为模板进行 PCR 扩增,扩增 PCR 产物预期大小为 526 bp。

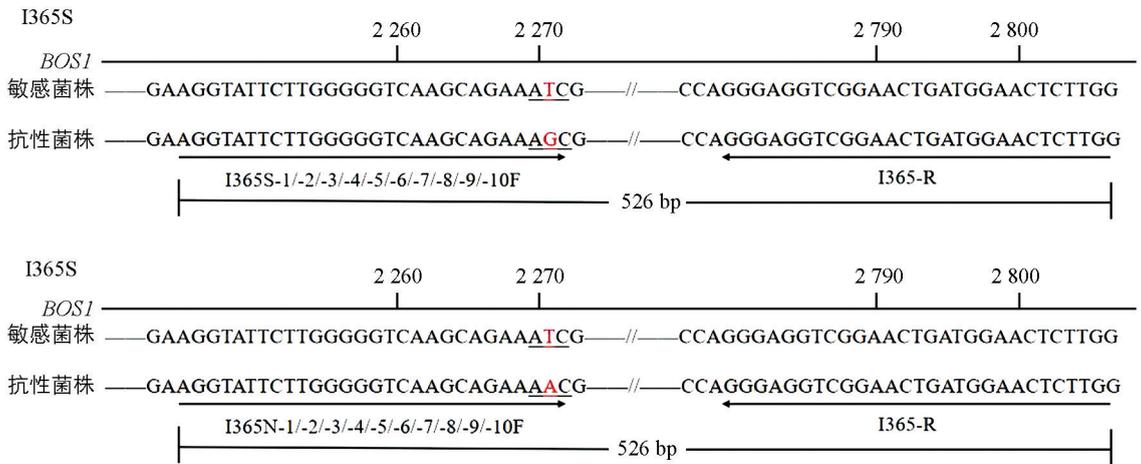


图 1 AS-PCR 引物设计模式图

表 1 根据 I365S 核苷酸突变位点设计的 AS-PCR 引物

引物	序列(5'-3')	引物	序列(5'-3')
I365S-1F	AGGTATTCTTGGGGGTCAAGCAGAAAG...	I365S-7F	AGGTATTCTTGGGGGTCAAGCAGAGAG...
I365S-2F	AGGTATTCTTGGGGGTCAAGCAGAATG...	I365S-8F	AGGTATTCTTGGGGGTCAAGCAGATGG...
I365S-3F	AGGTATTCTTGGGGGTCAAGCAGAACG...	I365S-9F	AGGTATTCTTGGGGGTCAAGCAGACGG...
I365S-4F	AGGTATTCTTGGGGGTCAAGCAGAAGG...	I365S-10F	AGGTATTCTTGGGGGTCAAGCAGAGGG...
I365S-5F	AGGTATTCTTGGGGGTCAAGCAGATAG...	I365-R	AAGAGTTCCATCAGTCCGACCTCCCT
I365S-6F	AGGTATTCTTGGGGGTCAAGCAGACAG...		

注：字母下划“\_”为突变碱基，字母下划“...”为错配碱基。

表 2 根据 I365N 核苷酸突变位点设计的 AS-PCR 引物

引物	序列(5'-3')	引物	序列(5'-3')
I365N-1F	AGGTATTCTTGGGGGTCAAGCAGAAAA...	I365N-7F	AGGTATTCTTGGGGGTCAAGCAGAGAA...
I365N-2F	AGGTATTCTTGGGGGTCAAGCAGAATA...	I365N-8F	AGGTATTCTTGGGGGTCAAGCAGATGA...
I365N-3F	AGGTATTCTTGGGGGTCAAGCAGAACA...	I365N-9F	AGGTATTCTTGGGGGTCAAGCAGACGA...
I365N-4F	AGGTATTCTTGGGGGTCAAGCAGAAGA...	I365N-10F	AGGTATTCTTGGGGGTCAAGCAGAGGA...
I365N-5F	AGGTATTCTTGGGGGTCAAGCAGATAA...	I365-R	AAGAGTTCCATCAGTCCGACCTCCCT
I365N-6F	AGGTATTCTTGGGGGTCAAGCAGACAA...		

注：字母下划“\_”为突变碱基，字母下划“...”为错配碱基。

### 1.2.2 AS-PCR 反应退火温度的确定

为明确 10 对引物是否可以区分敏感菌株和抗性菌株，分别以敏感菌株 B05.10、 $BOS1^{I365S}$  点突变菌株 CS3、 $BOS1^{I365N}$  点突变菌株 B1 的 DNA 为模板进行 AS-PCR 进行扩增，ddH<sub>2</sub>O 作为空白对照。每组引物设置 8 个退火温度(68 °C、67 °C、66 °C、63 °C、61 °C、58 °C、57 °C 和 56 °C)进行扩增。反应体系：2×Taq Master Mix 12.5 μL、10 μmol/L 正反向引物各 1 μL、DNA 模板 1 μL 和 ddH<sub>2</sub>O 补足至 25 μL；反应程序：95 °C 预变性 3 min；95 °C 变性 30 s，退火 30 s，72 °C 延伸 1 min，共 34 次循环；72 °C 终延伸 10 min。PCR 反应后用 1% 琼脂凝胶电泳并记录结果。

### 1.2.3 多重 AS-PCR 特异性引物与内参引物浓度的确定

为避免假阴性出现，本实验特引入内参引物进行多重 AS-PCR 扩增。内参引物选用真菌的通用 ITS 引物 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')和 ITS86(5'-GTGAATCATCGAATCTTTGAAC-3')。内参引物和特异性引物的浓度比例分别设置为 1:1、1:2、1:4 和 1:5，即特异性引物浓度为 10 μmol/L，

内参引物浓度分别为 10  $\mu\text{mol/L}$ 、5  $\mu\text{mol/L}$ 、2.5  $\mu\text{mol/L}$  和 2  $\mu\text{mol/L}$ 。反应体系同 1.2.2, 程序中退火温度为最适退火温度。

#### 1.2.4 多重 AS-PCR 反应体系特异性的检测

为评价引物的特异性, 分别选择小麦赤霉病菌、高粱炭疽病菌、稻瘟病菌、稻曲病菌、核盘菌、木霉菌以及灰葡萄孢菌标准菌株 B05.10 和抗性菌株(CS3 和 B1)DNA 作为模板, 反应体系和程序同 1.2.3。

#### 1.2.5 多重 AS-PCR 反应体系灵敏度的检测

将提取的抗性菌株 DNA 模板梯度稀释为原浓度的  $10^0$ 、 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  和  $10^{-6}$ 。得到 7 个 DNA 浓度梯度进行 AS-PCR 反应灵敏度检测, 反应体系和程序同 1.2.3。

#### 1.2.6 AS-PCR 检测体系的验证

本研究采用灰葡萄孢菌菌株进行检测体系的验证, 即 *BOS1*<sup>I365S</sup> (CS8、H9 和 XM9) 和 *BOS1*<sup>I365N</sup> (B31、B32 和 XM5) 点突变菌株和敏感菌株(C25、lp1 和 H4)的 DNA 为模板, 反应体系和程序同 1.2.3。

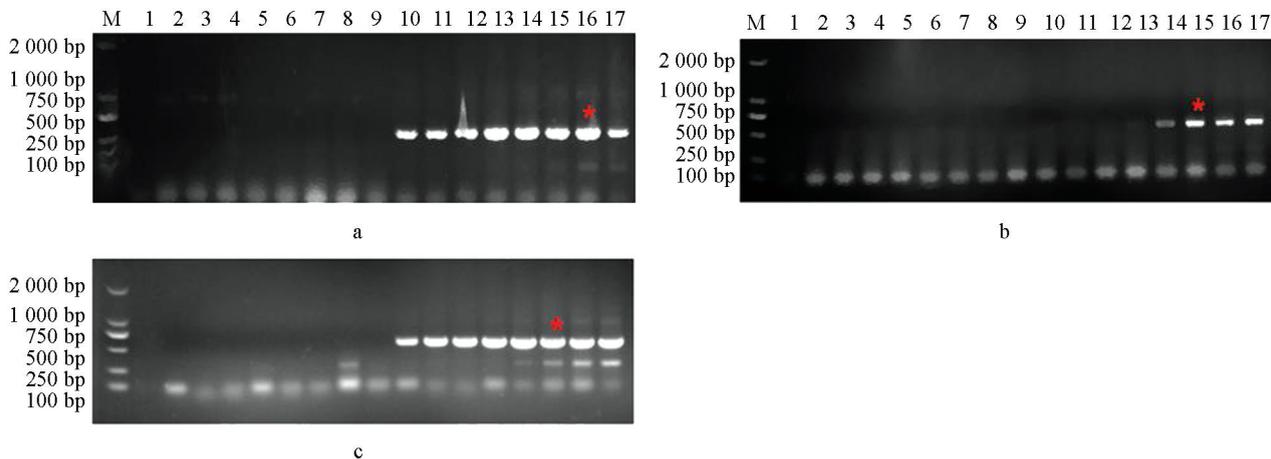
#### 1.2.7 AS-PCR 检测体系田间应用

本研究利用在重庆市北碚区本勋农业园(106.44°E, 29.76°N)采集的草莓灰霉病病果, 挑取病果表面的菌丝和孢子, 采用 NaOH 裂解法<sup>[39]</sup>直接快速提取病原菌 DNA, 反应体系中 DNA 量相应改为 5  $\mu\text{L}$ , 其他成分和反应程序同 1.2.3。将 AS-PCR 检测结果为阳性的部分菌株 PCR 扩增的 *BOS1* 基因产物送至上海生物工程有限公司测序, 将测序结果翻译成蛋白序列与 NCBI 中标准菌株 B05.10 用 DNAMAN 软件进行氨基酸比对。

## 2 结果与分析

### 2.1 AS-PCR 特异性引物

利用上述根据突变位点设计的引物, 分别以 *BOS1*<sup>I365S</sup> 点突变菌株 CS3、*BOS1*<sup>I365N</sup> 点突变菌株 B1 和敏感菌株 B05.10 的 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 引物对 I365-7F/I365-R 和 I365S-8F/I365-R 均只能在以 *BOS1*<sup>I365S</sup> 点突变菌株为模板情况下扩增出条带(图 2a、2b); 引物对 I365N-8F/I365-R 也仅在以 *BOS1*<sup>I365N</sup> 点突变菌株为模板情况下才能扩增出条带(图 2c)。说明筛选过的这 3 组引物可区分敏感和抗性菌株, 由此, 选择这 3 组引物进行后续试验。



a、b 为检测 I365S 突变电泳图, 引物对分别为 I365S-7F/I365-R、I365S-8F/I365-R。c 为检测 I365N 突变方式电泳图, 引物对为 I365N-8F/I365-R。泳道 M: 2 000 DNAmarker; 1: ddH<sub>2</sub>O 对照。2~9: 敏感菌株 DNA 为模板, 退火温度分别为 68  $^{\circ}\text{C}$ 、67  $^{\circ}\text{C}$ 、66  $^{\circ}\text{C}$ 、63  $^{\circ}\text{C}$ 、61  $^{\circ}\text{C}$ 、58  $^{\circ}\text{C}$ 、57  $^{\circ}\text{C}$  和 56  $^{\circ}\text{C}$ ; 10~17: 抗性菌株 DNA 为模板, 退火温度为 68  $^{\circ}\text{C}$ 、67  $^{\circ}\text{C}$ 、66  $^{\circ}\text{C}$ 、63  $^{\circ}\text{C}$ 、61  $^{\circ}\text{C}$ 、58  $^{\circ}\text{C}$ 、57  $^{\circ}\text{C}$  和 56  $^{\circ}\text{C}$ 。

图 2 特异性引物的二甲酰亚胺抗性/敏感菌株扩增结果

### 2.2 最适的退火温度

以 *BOS1*<sup>I365S</sup> 点突变菌株 CS3、*BOS1*<sup>I365N</sup> 点突变菌株 B1 和敏感菌株 B05.10 为模板, 在不同退火温度下进行扩增, 电泳检测结果如图 2。引物对 I365S-7F/I365-R 和 I365N-8F/I365-R 在退火温度为

56~68 °C 时均能扩增出条带(图 2a、2c), 引物对 I365S-8F/I365-R 在退火温度为 56~61 °C 时扩增出条带(图 2b), 且图 2a 中 16 泳道、b 和 c 中 15 泳道条带最亮, 最终确定引物对 I365S-7F/I365-R 退火温度为 57 °C、I365S-8F/I365-R 和 I365N-8F/I365-R 退火温度为 58 °C。

### 2.3 多重 AS-PCR 内参引物浓度

真菌通用引物为 ITS1/ITS4, 但由于该组引物扩增出的内参片段大小与目标片段差距不大, 在利用凝胶电泳进行检测时无法区分目标片段与内参片段。所以本研究选用 ITS4/ITS86 作为内参引物, 并利用该组通用引物与特异性引物进行多重 AS-PCR 扩增。当特异性引物与内参引物浓度比例为 4 : 1 时, 敏感菌株扩增出的内参条带较微弱, 但当比例为 2 : 1 时, 敏感和抗性菌株内参条带扩增条带较亮且更加稳定(图 3)。因此, 最终确定内参引物与特异性引物浓度比例为 1 : 2, 即内参引物浓度为 5  $\mu\text{mol/L}$ 。

### 2.4 多重 AS-PCR 的特异性

本研究选用不同真菌以及灰葡萄孢标准菌株 B05.10 和抗性菌株(CS3 和 B1)对该体系的特异性进行评价, 分别以该菌株为模板进行 PCR 扩增, 结果如图 4 所示, 其 a、b 和 c 分别对应引物对 I365S-7F/I365-R、I365S-8F/I365-R 和 I365N-8F/I365-R, 只有抗性菌株能够扩增出特异性和内参 2 种条带, 其他真菌均只能扩增出内参条带, 说明该体系具有特异性。

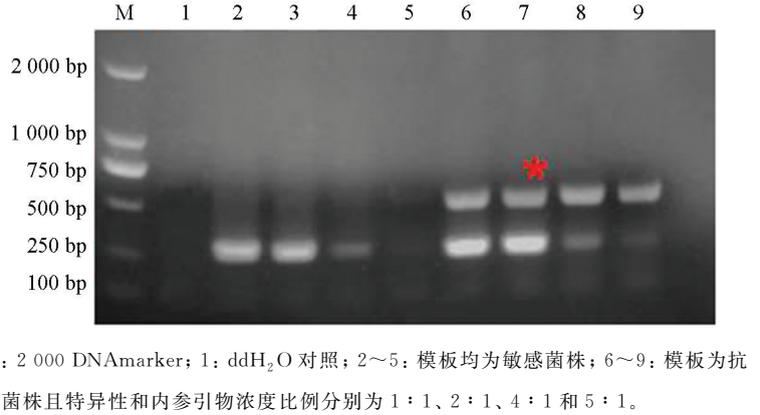
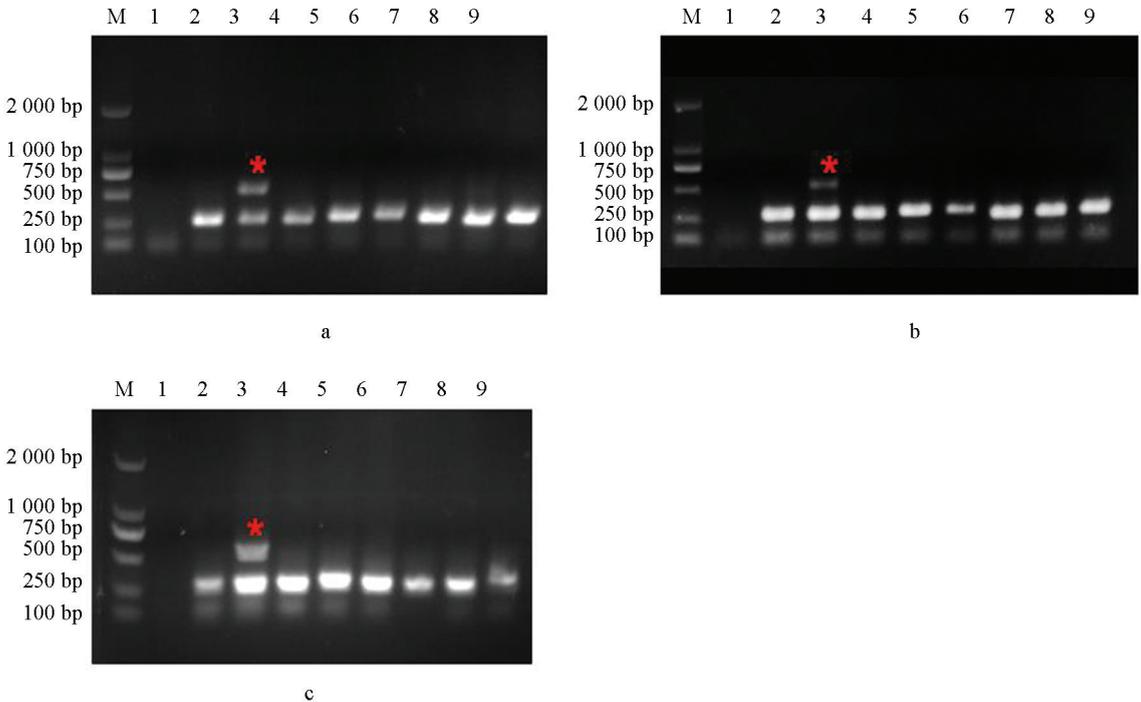


图 3 内参引物浓度筛选

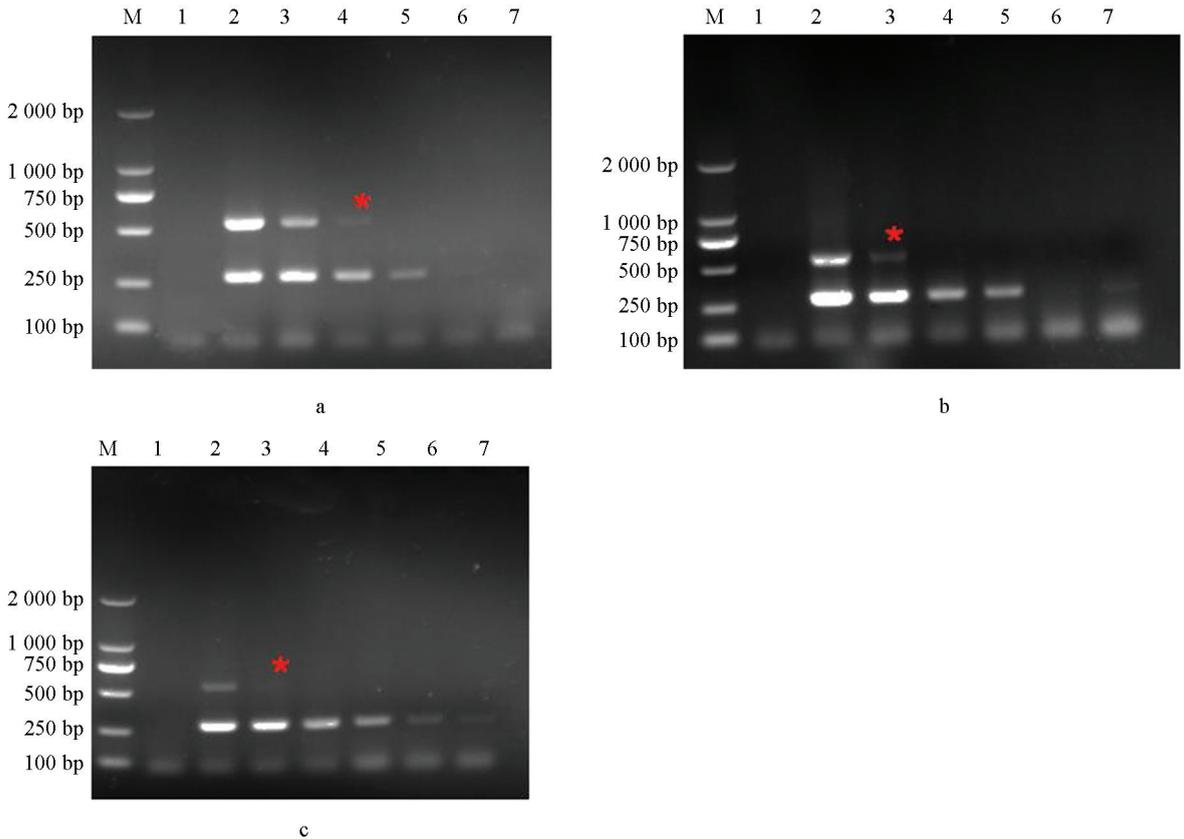


a-引物对 I365S-7F/I365-R; b-引物对 I365S-8F/I365-R; c-引物对 I365N-8F/I365-R。M: 2 000 DNAMarker; 1: ddH<sub>2</sub>O 对照; a、b 图中 2~9: 模板为敏感菌株 B05.10、I365S 突变方式菌株 CS3、小麦赤霉病菌、木霉菌、稻曲病菌、核盘菌、高粱炭疽病菌和稻瘟病菌; c 图中 2~9: 模板为敏感菌株 B05.10、I365N 突变方式抗性菌株 B1、小麦赤霉病菌、木霉菌、稻曲病菌、核盘菌、高粱炭疽病菌和稻瘟病菌。

图 4 不同种属间灰葡萄孢菌对二甲酰亚胺杀菌剂抗性 AS-PCR 检测体系的特异性检测

## 2.5 多重 AS-PCR 的灵敏度

将抗性菌株模板( $70 \text{ ng}/\mu\text{L}$ )梯度稀释后进行扩增, 电泳结果见图 5, a 中引物对 I365S-7F/I365-R 可在稀释度  $10^{-2}$  时扩增出特异性条带, b 和 c 中引物对 I365S-8F/I365-R 和 I365N-8F/I365-R 可在稀释度为  $10^{-1}$  时扩增出特异性条带, 即引物对 I365S-7F/I365-R、I365S-8F/I365-R 和 I365N-8F/I365-R 的灵敏度分别为  $0.7 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 、 $7 \text{ ng}/\mu\text{L}$  和  $7 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。



a 中引物对 I365S-7F/I365-R; b 中引物对 I365S-8F/I365-R; c 中引物对 I365N-8F/I365-R。M: 2 000 DNAmarker; 1: ddH<sub>2</sub>O 对照; 2-7: 稀释度为  $10^0$ 、 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  和  $10^{-6}$ 。

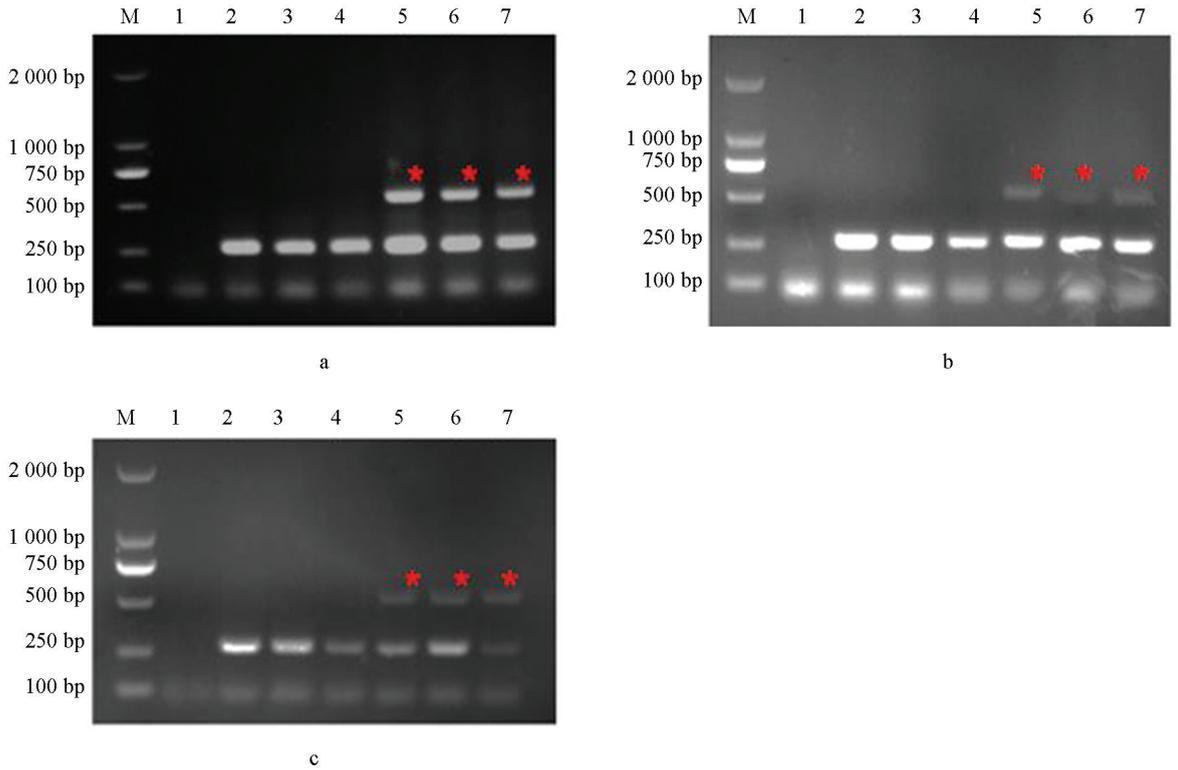
图 5 灰葡萄孢菌对二甲酰亚胺杀菌剂抗性 AS-PCR 检测体系的灵敏度检测

## 2.6 验证 AS-PCR 检测体系

本研究首先选用 3 株敏感菌株(C25、lp1 和 H4)和 6 株分别为 I365S(CS8、H9 和 XM9)、I365N(B31、B32 和 XM5)突变方式的抗性菌株来检测这 4 组引物特异性稳定性。如图 6 所示, a、b 和 c 分别对应引物对 I365S-7F/I365-R、I365S-8F/I365-R 和 I365N-8F/I365-R, 3 组引物在以抗性菌株为模板的情况下均能扩增出 2 条带, 在以敏感菌株为模板的情况下只能扩增出 1 条带, 说明该体系能够区分抗性和敏感菌株。

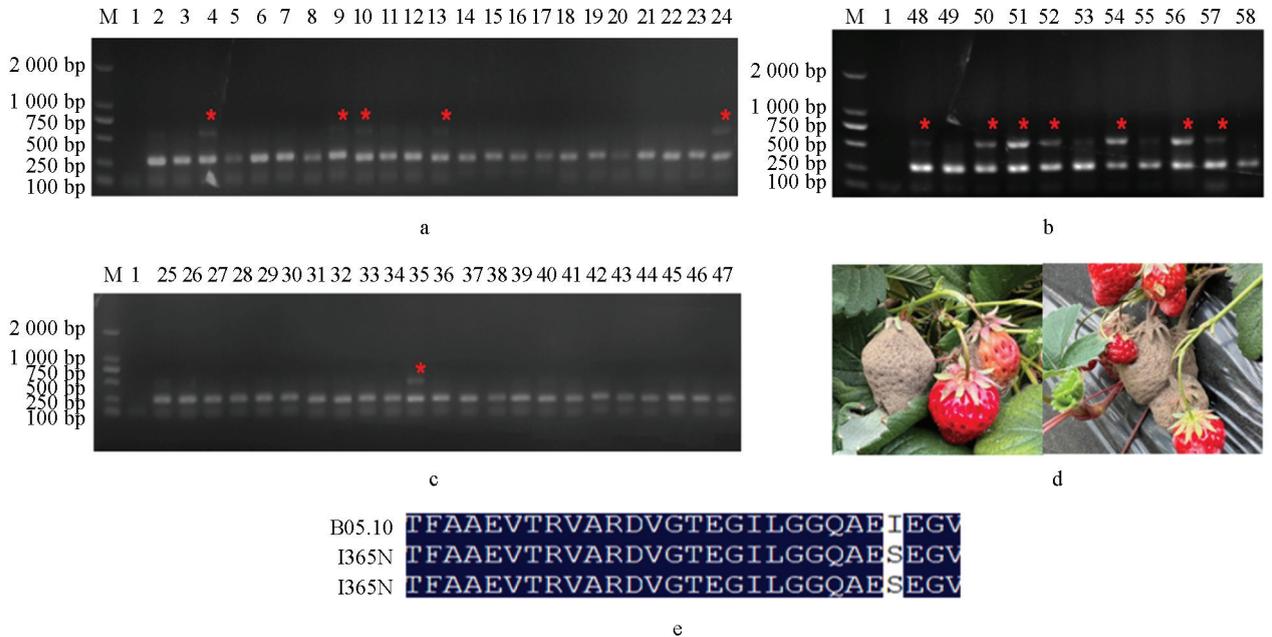
## 2.7 田间应用 AS-PCR 检测体系

将田间采集的样本取样 57 个并粗提 DNA 为模板进行 PCR 检测, 发现其中 13 个样本可在 I365S 检测体系中检测出 2 条 PCR 产物(图 7a-7c), 抗性菌株比例为 22.8%; 22 个样本可在 I365N 检测体系中检测出 2 条 PCR 产物(图 8a-8c), 抗性菌株比例为 38.6%, 说明这些样本中可能分别含有 I365S 和 I365N 突变方式抗性菌株。然后扩增比对 AS-PCR 检测为阳性的部分菌株的 *BOS1* 基因, 确证其抗性突方式分别为 I365S(图 7e)和 I365N(图 8e)。以上结果说明本 AS-PCR 检测体系可以快速准确地应用于田间灰葡萄孢菌二甲酰亚胺杀菌剂抗性。



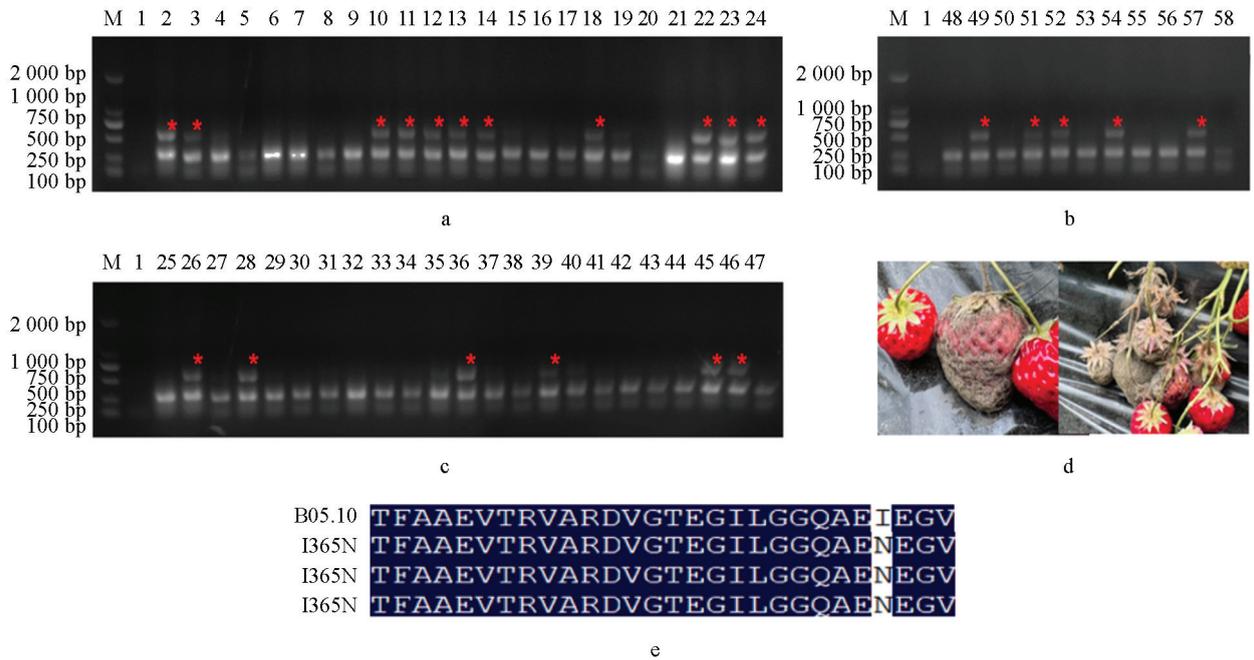
a~b: 所用引物分别为 I365S-7F/I365-R+ITS86/ITS4 和 I365S-8F/I365-R+ITS86/ITS4; M: 2 000 DNAmarker; 1: ddH<sub>2</sub>O 对照; 2~4: 模板为敏感菌株 C25、lp1 和 H4; 5~7: 模板为抗性菌株 CS8、H9 和 XM9。c: 所用引物 3I365N-8F/3I365-R+ITS86/ITS4; M: 2 000 DNAmarker; 1: ddH<sub>2</sub>O 对照; 2~4: 模板为敏感菌株 C25、lp1 和 H4; 5~7: 模板为抗性菌株 B31、B32 和 XM5。

图 6 同种间灰葡萄孢菌对二甲酰亚胺杀菌剂抗性 AS-PCR 检测体系的特异性检测



a~c 中 1 为 ddH<sub>2</sub>O 对照; 2~58 为 57 个田间菌株; d 为采集的田间样本; e 为 I365S 检测引物对扩增后的测序结果。

图 7 BOS1<sup>I365S</sup> 点突变菌株 AS-PCR 检测体系的田间应用与验证



a~c 中 1 为 ddH<sub>2</sub>O 对照; 2~58 为 57 个田间菌株; d 为采集的田间样本; e 为 I365N 检测引物对扩增后的测序结果。

图 8 BOS1<sup>I365N</sup> 点突变菌株 AS-PCR 检测体系的田间应用与验证

### 3 结论与讨论

由于缺少优良的抗病品种, 目前灰葡萄孢菌主要以化学防治为主。二甲酰亚胺类杀菌剂(Dicarboximide Fungicides, DCFs)于 20 世纪 70 年代引入中国, 随着该药剂的广泛使用, 近些年在中国江苏<sup>[12]</sup>、四川<sup>[11]</sup>、辽宁<sup>[40]</sup>等地区都检测到了高频的 DCFs 抗性菌株。抗性检测技术的建立是防治的基础, 为能够及时了解地区抗性发展情况调整用药策略, 建立抗性检测技术是非常必要的。

传统抗性检测方法用时较长、工作量大、试验条件严格。随着分子生物学技术的发展, 许多现代分子技术在抗药性检测中得到了很好的应用, 特别是基于 PCR 的检测技术, 如实时荧光定量、高分辨率溶解曲线法、双杂交探针法和限制性片段长度多态性等, 但这些方法应用仪器精密度高、价格昂贵且步骤繁琐, 并不适用于田间应用。等位基因特异性 PCR 技术具有操作简单、过程开盖次数少而污染概率低、特异性强、成本相对低(只需要一台 PCR 仪和一对特异性引物即可实现检测)、时间相对快速等优点, 已经有许多研究者利用该技术成功检测出抗药性菌株, 如 Muñoz 等<sup>[41]</sup>、Yin 等<sup>[42]</sup>和 Oshima 等<sup>[22]</sup>分别成功利用该技术检测了灰葡萄孢菌苯对苯并咪唑类、琥珀酸脱氢酶抑制剂类和甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂抗性菌株。但国内外尚没有应用该技术检测灰葡萄孢菌对 DCFs 抗性的报道。

前期研究发现, 重庆地区灰葡萄孢菌 DCFs 抗性菌株中 BOS1<sup>I365N</sup> (52.1%) 和 BOS1<sup>I365S</sup> (37.5%) 点突变占比较大<sup>[28]</sup>, 因此, 本研究建立的多重 AS-PCR 检测体系对于监测灰葡萄孢菌对 DCFs 抗性频率具有较好的应用价值。

本研究成功建立了可快速检测灰葡萄孢菌对 DCFs 抗性的 AS-PCR 技术, 最终确定为 3 组引物 I365S-7F/I365-R、I365S-8F/I365-R 和 I365N-8F/I365-R 可分别特异性区分 BOS1<sup>I365S</sup> 和 BOS1<sup>I365N</sup> 点突变菌株, 并对反应条件和反应体系进行优化, 提高了该检测技术的特异性和扩增效率, 最后应用于田间样本快速检测, 证明该方法可行。

在引物设计时, 需在突变点前后 1~2 个碱基进行错配<sup>[43]</sup>, 是因为 DNA 聚合酶理想情况下需要在引物与模板完全匹配的情况下才能顺利扩增, 但实际情况中引物 3' 末端与模板不互补也能实现延伸扩增。错配

不同会影响最终扩增效率和特异性,如罗梅等<sup>[36]</sup>在进行引物筛选时,引入 G-A 错配时无法区分敏感和抗性菌株,但 G-C 错配可实现区分且扩增较稳定,当错配 2 个碱基时扩增效率低。本研究中 G-C 错配可很好地实现区分,且错配为 2 个碱基 AA-TG 时也可明显区分且扩增效率尚可,说明建立检测体系可能因引物靶标序列和引物长度的不同具有差异性,所以在建立检测体系时需要根据具体靶标来设计错配并经过重复试验反复验证,从而筛选出能够特异性检测出抗性菌株的引物对。

为保证试验数据的可靠性,引入内参引物进行多重 AS-PCR,可选择真菌通用引物<sup>[37]</sup>或其他非靶标基因<sup>[36,44]</sup>。本研究选用前者,常用引物对为 ITS1/ITS4,该内参引物在灰葡萄孢菌中扩增产物与特异性引物扩增产物相差小,电泳无法区分,通过 ITS 区内参引物筛选,最终确定 ITS4/ITS86 引物作为内参进行多重 PCR。内参引物的引入可以很好地排除假阴性的干扰,且节约了试剂、DNA 模板等原料。但由于不同引物在同一体系中同时扩增存在模板和试剂竞争,所以在多重 PCR 扩增过程中需要调节特异性引物和内参引物浓度比例。本研究发现特异性引物和内参引物的比例为 4:1 时条带较浅,且由于人工操作重复加入的每个相同体系时存在的误差会导致该引物扩增不出产物,所以最终选择特异性引物和内参引物 ITS4/ITS86 浓度比例为 2:1。

特异性检测表明,该检测技术可以准确地从同种或不同种群体中检测到 DCFs 抗性菌株,具有很高的特异性。为能够更贴近田间实际应用,将 CTAB 大量精提 DNA 的方法替换为少量粗提的 NaOH 裂解法,将田间菌株在不进行分离纯化情况下粗提 DNA 作为模板进行 PCR 检测,扩增出特异性条带的菌株为 *BOS1*<sup>I365S</sup>、*BOS1*<sup>I365N</sup> 点突变,且该检测结果与测序结果一致。这简化了病原菌 DNA 提取步骤,缩短了操作时间,使得检测更加简单快速。

Muñoz 等<sup>[41]</sup>设计 2 对引物并成功检测灰葡萄孢菌抗苯并咪唑类杀菌剂 β-微管蛋白 E198A 点突变菌株。每对引物其中 1 条为 3' 末端位于突变位点上的内引物,两条引物方向相反,且分属于不同基因型(突变序列与野生型);另外两条为通用外引物,且两条引物与突变位点的距离不一样。这样,在反应过程中,无论检测模板为突变型或者野生型,其扩增产物都为两种,但产物片段长度不一,因此,根据扩增出的片段长度即可辨别该菌株是否为突变型,但该体系只能检测 1 种突变方式。目前,本研究通过设计 2 对引物分别在 2 个体系内将 *BOS1*<sup>I365S</sup> 和 *BOS1*<sup>I365N</sup> 点突变菌株进行区分,可采取上述 Muñoz 等<sup>[41]</sup>的方式同时加入内参引物,即可在一个体系内排除假阴性干扰的情况下又能同时检测 2 种突变方式。

## 参考文献:

- [1] ALIZADEH H R, SHARIFI-TEHRANI A, HEDJAROUDE G A. Evaluation of the Effects of Chemical Versus Biological Control on *Botrytis cinerea* Agent of Gray Mould Disease of Strawberry [J]. Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences, 2007, 72(4): 795-800.
- [2] WILLIAMSON B, TUDZYNSKI B, TUDZYNSKI P, et al. *Botrytis cinerea*: The Cause of Grey Mould Disease [J]. Molecular Plant Pathology, 2007, 8(5): 561-580.
- [3] AVENOT H, SIMONEAU P, IACOMI-VASILESCU B, et al. Characterization of Mutations in the Two-Component Histidine Kinase Gene *AbNIK1* from *Alternaria brassicicola* that Confer High Dicarboximide and Phenylpyrrole Resistance [J]. Current Genetics, 2005, 47(4): 234-243.
- [4] DUAN Y B, GE C Y, ZHOU M G. Molecular and Biochemical Characterization of *Sclerotinia sclerotiorum* Laboratory Mutants Resistant to Dicarboximide and Phenylpyrrole Fungicides [J]. Journal of Pest Science, 2014, 87(1): 221-230.
- [5] JIANG J H, DING L S, MICHAILIDES T J, et al. Molecular Characterization of Field Azoxystrobin-Resistant Isolates of *Botrytis cinerea* [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2009, 93(2): 72-76.
- [6] 赵建江,王文桥,马志强,等. 啶酰菌胺与吡唑醚菌酯混配对灰葡萄孢的增效作用 [J]. 农药, 2016, 55(3): 211-213.

- [7] 祝明亮, 严金平, 孙启玲, 等. 植物病原真菌对二甲酰亚胺类杀菌剂的抗性分子机制 [J]. 生物技术, 2005, 15(5): 95-97.
- [8] MAIA J N, BEGER G, PEREIRA W V, et al. Gray Mold in Strawberries in the Paraná State of Brazil Is Caused by *Botrytis cinerea* and Its Isolates Exhibit Multiple-Fungicide Resistance [J]. Crop Protection, 2021, 140: 105415.
- [9] 宋晰, 肖露, 林东, 等. 番茄灰霉病菌对腐霉利的抗药性检测及生物学性状研究 [J]. 农药学学报, 2013, 15(4): 398-404.
- [10] 杜颖. 辽宁省番茄灰霉病菌对腐霉利抗药性机制及快速检测技术研究 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2018.
- [11] 裴艳刚, 朱宇航, 岁立云, 等. 四川猕猴桃灰霉病菌对4种杀菌剂的抗药性检测 [J]. 植物保护, 2021, 47(4): 180-185.
- [12] 肖婷, 钱荣明, 张富荣, 等. 江苏省域草莓灰霉病菌种群多药剂抗性检测 [J]. 中国农学通报, 2022, 38(14): 110-117.
- [13] CUI W, BEEVER R E, PARKES S L, et al. An Osmosensing Histidine Kinase Mediates Dicarboximide Fungicide Resistance in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) [J]. Fungal Genetics and Biology, 2002, 36(3): 187-198.
- [14] LEROUX P, FRITZ R, DEBIEU D, et al. Mechanisms of Resistance to Fungicides in Field Strains of *Botrytis cinerea* [J]. Pest Management Science, 2002, 58(9): 876-888.
- [15] MA Z H, MICHAILIDES T J. Advances in Understanding Molecular Mechanisms of Fungicide Resistance and Molecular Detection of Resistant Genotypes in Phytopathogenic Fungi [J]. Crop Protection, 2005, 24(10): 853-863.
- [16] ORTH A B, RZHETSKAYA M, PELL E J, et al. A Serine (Threonine) Protein Kinase Confers Fungicide Resistance in the Phytopathogenic Fungus *Ustilago maydis* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(6): 2341-2345.
- [17] 陈夕军, 王艳, 童蕴慧, 等. 灰葡萄孢抗二甲酰亚胺类杀菌剂研究进展 [J]. 植物保护, 2009, 35(3): 16-19.
- [18] 严蕾艳. 灰霉病菌双组分组氨酸激酶信号途径上五个关键基因的功能研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2011.
- [19] LIU W W, LEROUX P, FILLINGER S. The HOG1-Like MAP Kinase Sak1 of *Botrytis cinerea* Is Negatively Regulated by the Upstream Histidine Kinase Bos1 and Is Not Involved in Dicarboximide- and Phenylpyrrole-Resistance [J]. Fungal Genetics and Biology, 2008, 45(7): 1062-1074.
- [20] CUI W, BEEVER R E, PARKES S L, et al. An Osmosensing Histidine Kinase Mediates Dicarboximide Fungicide Resistance in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) [J]. Fungal Genetics and Biology, 2002, 36(3): 187-198.
- [21] CUI W, BEEVER R E, PARKES S L, et al. Evolution of an Osmosensing Histidine Kinase in Field Strains of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) in Response to Dicarboximide Fungicide Usage [J]. Phytopathology ©, 2004, 94(10): 1129-1135.
- [22] OSHIMA M, FUJIMURA M, BANNO S, et al. A Point Mutation in the Two-Component Histidine Kinase *BcOS-1* Gene Confers Dicarboximide Resistance in Field Isolates of *Botrytis cinerea* [J]. Phytopathology, 2002, 92(1): 75-80.
- [23] BANNO S, FUKUMORI F, ICHIISHI A, et al. Genotyping of Benzimidazole-Resistant and Dicarboximide-Resistant Mutations in *Botrytis cinerea* Using Real-Time Polymerase Chain Reaction Assays [J]. Phytopathology, 2008, 98(4): 397-404.
- [24] MA Z H, YAN L Y, LUO Y, et al. Sequence Variation in the Two-Component Histidine Kinase Gene of *Botrytis cinerea* Associated with Resistance to Dicarboximide Fungicides [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2007, 88(3): 300-306.
- [25] MA Z H, MICHAILIDES T J. Characterization of Iprodione-Resistant *Alternaria* Isolates from Pistachio in California [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2004, 80(2): 75-84.
- [26] 贡常委, 秦旖曼, 屈劲松, 等. 四川省草莓灰霉病菌对咯菌腈的抗性测定及其机制 [J]. 中国农业科学, 2018, 51(22): 4277-4287.
- [27] 张鑫, 马雪梅. 灰霉病菌抗药位点及其分子检测方法研究进展 [J]. 生物技术进展, 2014, 4(4): 251-257.
- [28] 李鹏飞. 重庆市草莓灰霉病菌抗药性监测及抗药性机理研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2023.
- [29] ANON. Recommended Methods for the Detection and Measurement of Resistance of Agricultural Pests to Pesticides [J]. Food

and Agriculture Organization Plant Protection Bulletin, 1982; 30, 36-143.

- [30] ANON. FRAC Methods for Monitoring Fungicide Resistance [J]. Organization for Plant Protection of the European and Mediterranean Region Bulletin, West Sussex, 1991; 21, 291-354.
- [31] MA D C, ZHU J M, JIANG J G, et al. Evaluation of Bioactivity and Control Efficacy of Tetramycin Against *Corynespora cassicola* [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2018, 152: 106-113.
- [32] RAMPERSAD S N. A Rapid Colorimetric Microtiter Bioassay to Evaluate Fungicide Sensitivity among *Verticillium dahliae* Isolates [J]. Plant Disease, 2011, 95(3): 248-255.
- [33] 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.
- [34] PERCIVAL G C, BOYLE S. Evaluation of Film Forming Polymers to Control Apple Scab (*Venturia inaequalis* (Cooke) G. Wint.) under Laboratory and Field Conditions [J]. Crop Protection, 2009, 28(1): 30-35.
- [35] MA Z H, YOSHIMURA M A, MICHAILIDES T J. Identification and Characterization of Benzimidazole Resistance in *Monilinia fructicola* from Stone Fruit Orchards in California [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(12): 7145-7152.
- [36] 罗梅, 阴伟晓, 罗朝喜. 桃褐腐病菌对多菌灵抗性的 AS-PCR 检测技术 [J]. 植物保护, 2020, 46(6): 136-143, 154.
- [37] 郭东锋, 钟林宇, 周挺, 等. 马铃薯晚疫病菌对甲霜灵抗性的快速检测方法 [J]. 植物保护学报, 2023, 50(1): 214-223.
- [38] CONLON B H, SCHMIDT S, POULSEN M, et al. Orthogonal Protocols for DNA Extraction from Filamentous Fungi [J]. STAR Protocols, 2022, 3(1): 101126.
- [39] 申利娜. 禾谷镰孢菌异核体多菌灵抗性的表达规律及川渝地区小麦赤霉病菌田间抗药性监测 [D]. 重庆: 西南大学, 2023.
- [40] 纪明山, 刘妍, 朱赫, 等. 辽宁省番茄灰霉病菌对常用杀菌剂的抗药性监测与交互抗药性 [J]. 农药, 2017, 56(9): 676-678.
- [41] MUÑOZ C, GÓMEZ TALQUENCA S, VOLPE M L. Tetra Primer ARMS-PCR for Identification of SNP in B-Tubulin of *Botrytis cinerea*, Responsible of Resistance to Benzimidazole [J]. Journal of Microbiological Methods, 2009, 78(2): 245-246.
- [42] 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.
- [43] 赵培宝, 周庆新, 郭芳先, 等. 限制性内切酶介导的串珠镰刀菌插入突变和致病性突变体的分离 [J]. 植物病理学报, 2007, 37(5): 545-548.
- [44] HASHIMOTO M, AOKI Y, SAITO S, et al. Characterisation of Heteroplasmic Status at Codon 143 of the *Botrytis cinerea* Cytochrome b Gene in a Semi-Quantitative AS-PCR Assay [J]. Pest Management Science, 2015, 71(3): 467-477.

责任编辑 王新娟