

山西省清徐县葡萄霜霉菌对烯酰吗啉的抗药性分析

王喜娜¹, 王敏², 孔繁芳¹, 王忠跃^{1*}, 张昊^{1*}

(1. 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193;

2. 山西省农业科学院果树研究所, 太原 030031)

摘要 葡萄霜霉病是葡萄最重要的病害之一, 目前防治霜霉病主要依赖化学药剂, 其中羧酸酰胺类杀菌剂是一类重要药剂, 然而病原菌抗药性对其防效有重要影响。2015 年本实验室首次在中国检测到抗烯酰吗啉的葡萄霜霉菌, 并开发了 Tetra-Primer ARMS PCR 快速检测法来检测抗药性。本研究利用此技术对采自山西省清徐县 60 株葡萄霜霉菌进行了烯酰吗啉抗性检测, 结果显示其中 1 株具有抗药性, 其他 59 株均为敏感菌株, 说明该地区霜霉菌已经开始产生烯酰吗啉抗性, 但尚未大范围扩展, 需要进行持续监测以指导杀菌剂的使用, 这也是首次报道山西省葡萄霜霉菌存在烯酰吗啉抗性菌株。

关键词 葡萄霜霉菌; Tetra-Primer ARMS PCR 技术; 烯酰吗啉; 抗药性

中图分类号: S 436.631.1 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2017090

Identification of the dimethomorph-resistant isolates of *Plasmopara viticola* populations in Qingxu, Shanxi Province

WANG Xina¹, WANG Min², KONG Fanfang¹, WANG Zhongyue¹, ZHANG Hao¹

(1. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China;

2. Shanxi Academy of Agricultural Sciences Pomology Institute, Taiyuan 030031, China)

Abstract Grape downy mildew is one of the most important diseases of grape. Chemical control is the most effective strategy for controlling this disease so far and carboxylic acid amide (CAA) fungicides are the main agents. However, the efficacy of CAAs in the field is limited due to developmental resistance of pathogen. In 2015, we detected dimethomorph-resistant *Plasmopara viticola* in China for the first time and developed the Tetra-Primer ARMS PCR method for dimethomorph-resistance detection. Based on this method, 60 isolates of *P. viticola* collected from Qingxu County of Shanxi Province were identified. The results showed that one strain was resistant to dimethomorph and the others were all sensitive, indicating the presence of dimethomorph-resistant *P. viticola* in this region. Although the low resistance frequency suggested that the resistance allele had not spread widely, continuous monitoring is required for the use of fungicides. This is also the first report of dimethomorph-resistant strains of *P. viticola* in Shanxi.

Key words *Plasmopara viticola*; tetra-primer ARMS PCR; dimethomorph; fungicide resistance

葡萄霜霉病是由葡萄单轴霜霉 *Plasmopara viticola* (Berk et Curtis) Berl. et de Toni 引起的。该病原菌为专性寄生菌^[1], 属于卵菌门、卵菌纲、霜霉目、霜霉科、单轴霉属^[2]。葡萄霜霉菌可以侵染葡萄的任何绿色部分或组织, 如叶片、嫩梢、幼果等, 造成品质降低、产量下降, 严重时绝产绝收, 对我国的葡萄种

植业和葡萄酒酿造业产生严重影响^[3]。目前, 葡萄霜霉病的防治措施有: 选用抗性品种、预报预警、化学防治、生物防治、切断侵染途径的避雨栽培措施等, 其中化学防治是最主要的防治手段。

羧酸酰胺类杀菌剂是防治霜霉病的主要化学药剂之一, 是一类单靶标位点的化学农药, 包括烯酰吗

收稿日期: 2017-03-17 修订日期: 2017-05-18

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项(201203035); 国家现代农业产业技术体系(nycytx-30); 中国农业科学院科技创新工程项目

* 通信作者 E-mail: wangzhy0301@sina.com; hzhang@ippcaas.cn

啉、双炔酰菌胺和氟吗啉等,其中烯酰吗啉是该类杀菌剂中最早被研发成功并投入市场的。研究发现烯酰吗啉对霜霉病有特效且与甲霜灵和苯酰胺类杀菌剂无交互抗性,因此被广泛使用^[4]。羧酸酰胺类杀菌剂主要作用机理是抑制孢子囊形成。纤维素合酶3(CesA3)是其作用的靶标^[5]。目前,葡萄霜霉菌对羧酸酰胺类杀菌剂的抗性机制已经明确,抗性菌株CesA3基因的1105位密码子出现单碱基突变^[6]。

葡萄霜霉病对杀菌剂的抗性检测通常采用叶盘法^[7],这种方法存在检测周期长、效率低、工作量大且稳定性差等缺点。随着对羧酸酰胺类杀菌剂抗性机制的解析,采用分子方法进行病原菌对其抗性频率检测成为可能。基于引起羧酸酰胺类杀菌剂抗性的单核苷酸点突变,Aoki等报道了PCR-RFLP方法^[8],显著提高了检测效率,但此方法也存在一些固有的弊端,比如在聚合酶链式反应扩增后需要一步额外的限制性内切酶溶解来区分抗药型和敏感型等位基因。针对这一问题,本实验室建立了基于抗性突变的Tetra-primer ARMS PCR检测法^[9],该方法在一个聚合酶链式反应中加入两对引物,其中一对为针对抗性和敏感等位基因的内引物,另一对为外引物。在反应中外引物和内引物可以相互反应扩增出不同长度的产物并通过凝胶电泳将其区分。Tetra-primer ARMS PCR方法可以通过一个反应区分抗性和敏感的纯合子菌株以及敏感杂合子,快速准确。

病原菌对杀菌剂的抗性频率监测对于指导田间杀菌剂的合理使用、提高防效具有重要意义。近年来,由于化学药剂的连续频繁使用,病原菌抗药性越来越强,导致防效逐年下降,严重影响我国葡萄产业的发展^[10]。Tetra-primer ARMS PCR是目前检测葡萄霜霉菌对烯酰吗啉抗性最简便高效的方法之一,利用该方法,本实验室于2015年在我国广西首次检测到了烯酰吗啉抗性菌株,但其他产区的抗性情况尚不明确。本研究利用此方法对2016年采集自山西省清徐县葡萄霜霉菌进行了烯酰吗啉抗药性检测,研究结果将为该地区防治葡萄霜霉病的杀菌剂的合理使用及霜霉菌抗药性治理措施的制定提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株的纯培养

供试葡萄霜霉菌株于2016年采自山西省清

徐县马峪乡西迎南风村的‘龙眼’葡萄品种。田间采集新鲜、未使用杀菌剂的发病叶片,用无菌水冲洗3~4次后将叶背面向上置于1%的水琼脂培养基上,放于温度为21℃,光照条件为L/D=16 h/8 h,湿度为100%的光照培养箱内保湿培养,待重新长出新鲜菌丝之后,在显微镜下挑取单孢子囊,将其接种在直径为15 mm的‘里扎马特’叶盘上,然后置于培养箱中保湿培养,待叶盘上重新长出的新鲜霉层即为纯培养的葡萄霜霉菌,将采摘的60株菌株均进行单孢分离纯培养。

1.2 DNA的提取

用小毛刷将纯培养的霉层刷至2 mL离心管中,置于-80℃冰箱冻存24 h后放于55~80℃烘箱中将其烘干。在干燥后的菌丝体内加入适量的石英砂和玻璃珠,后将其放入MiniBeadbeater-96研磨仪模块,加入液氮冷冻,装入研磨仪研磨1 min。将研磨好的菌丝利用OMEGA公司的E-Z[®]96真菌基因组DNA提取试剂盒(D3390-02)提取DNA。

1.3 Tetra-primers ARMS PCR检测抗药性

引物^[9]Cesa3OF: 5'-GCACAGCAGACATGG-TTTTCCTT-3', Cesa3OR: 5'-GTCCAAAAGTGCA-AAGTCCAACG-3', Cesa3IW: 5'-TACCTTTACGGC-AAATGTGTGCG-3', Cesa3IM: 5'-GACAATGTAGCAACCAGCAACGATCT-3'。两条外引物Cesa3OF与Cesa3OR用来扩增敏感菌株与抗性菌株等位基因,目的条带612 bp,Cesa3IW针对敏感菌株等位基因,与Cesa3OR一起扩增可得到238 bp的目的条带,Cesa3IM针对抗性菌株等位基因,与Cesa3OF一起扩增可得到378 bp的目的条带。

PCR体系(20 μ L):10 mmol/L Tris-HCl,(pH 8.3),50 mmol/L KCl,1.5 mmol/L MgCl₂,200 μ mol/L dNTPs,引物Cesa3OF和Cesa3OR各0.25 μ mol/L,引物Cesa3IW和Cesa3IM各0.5 μ mol/L,0.5 unit 聚合酶(TaKaRa, Japan),20 ng基因组DNA。

PCR反应体系:95℃预变性2 min;95℃变性30 s,63℃退火30 s,72℃延伸30 s,30个循环;最后72℃延伸5 min。PCR产物用1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

将分离自山西省清徐县的60株样本进行纯培养后提取其DNA。采用Tetra-primer ARMS PCR

检测其对烯酰吗啉的抗性。结果显示有 59 株同时含有 612 bp 和 238 bp 的扩增条带,只有一株样本同时含有 612 bp 和 378 bp 的扩增片段。

表 1 山西省清徐县葡萄霜霉菌对烯酰吗啉的抗性检测¹⁾

Table 1 Detection of dimethomorph-resistant isolates of <i>Plasmopara viticola</i> from Qingxu, Shanxi Province			
菌株编号 Strain no.	抗性情况 S/R	菌株编号 Strain no.	抗性情况 S/R
ShX1	S	ShX31	S
ShX2	S	ShX32	S
ShX3	S	ShX33	S
ShX4	S	ShX34	S
ShX5	S	ShX35	S
ShX6	S	ShX36	S
ShX7	S	ShX37	S
ShX8	S	ShX38	S
ShX9	S	ShX39	S
ShX10	S	ShX40	S
ShX11	S	ShX41	S
ShX12	S	ShX42	S
ShX13	S	ShX43	S
ShX14	S	ShX44	S
ShX15	S	ShX45	S
ShX16	S	ShX46	S
ShX17	S	ShX47	S
ShX18	S	ShX48	S
ShX19	S	ShX49	S
ShX20	R	ShX50	S
ShX21	S	ShX51	S
ShX22	S	ShX52	S
ShX23	S	ShX53	S
ShX24	S	ShX54	S
ShX25	S	ShX55	S
ShX26	S	ShX56	S
ShX27	S	ShX57	S
ShX28	S	ShX58	S
ShX29	S	ShX59	S
ShX30	S	ShX60	S

1) S 和 R 分别代表敏感菌株与抗性菌株。
S and R represent sensitive and resistant isolates, respectively.

本实验室前期研究^[9]显示,同时含有 612 bp 和 238 bp 以及同时含有 612 bp 和 378 bp 的菌株均为纯合体,同时含有 612 bp、238 bp 及 378 bp 的菌株为杂合体。本实验室通过传统叶盘法验证了纯合的突变体对烯酰吗啉具有抗性,而具有敏感等位基因的纯合体和杂合体对烯酰吗啉是没有抗性的。山西省清徐县的 60 株样本均为纯合体,其中 59 株含有葡萄霜霉菌纤维素合酶 3 的敏感等位基因,其对烯酰吗啉敏感、无抗性,1 株菌株对烯酰吗啉具有抗性,这说明虽然该地区的抗性频率不高,但已经出现

对烯酰吗啉具有抗性的葡萄霜霉菌株。

3 讨论

葡萄霜霉病是葡萄种植中的重要病害,几乎存在于我国所有的葡萄生产园中,由于目前抗病的栽培品种较少,所以控制葡萄霜霉病主要依赖杀菌剂。然而,随着杀菌剂的连续频繁使用,葡萄霜霉菌逐渐产生抗药性,导致杀菌剂防效下降。烯酰吗啉在 20 世纪 80 年代开始投入市场,1994 年 Chabane 等在法国葡萄园中首次发现了抗烯酰吗啉的葡萄霜霉菌菌株^[10],随后在意大利、瑞士等国也相继发现抗性菌株^[7,11],抗性产生初期,由于抗性频率较低,并未明显影响防效,但随着羧酸酰胺类杀菌剂种类和用量不断增加,菌株抗性频率急剧上升^[12]。1996 年烯酰吗啉在中国登记,至今已经使用 20 多年,是我国葡萄霜霉病防治最主要的杀菌剂之一。在中国,葡萄霜霉菌杀菌剂抗性相关研究较少,2010 年 Sun 等对采自全国 7 个省 11 个地区的葡萄霜霉菌进行烯酰吗啉敏感性测定,未发现抗性菌株^[13]。至 2016 年中国未见有关葡萄霜霉菌对烯酰吗啉具有抗药性的报道。2015 年本实验室在广西资源县的葡萄霜霉菌菌株中发现了对烯酰吗啉具有抗药性的菌株,这是国内首次关于葡萄霜霉菌对烯酰吗啉具有抗性的报道^[9],但我国其他葡萄产区,是否存在抗性菌株,抗性频率如何尚不清楚。抗药性的产生严重影响了药剂的选择,因此,检测葡萄霜霉菌的抗性频率对于田间杀菌剂的合理使用具有指导作用。

葡萄霜霉菌为专性寄生菌,它的生长需要寄主,培养条件较为严苛,用传统方法检测其抗性频率,既耗费时间且其结果易受培养条件和药剂质量的影响。随着部分杀菌剂抗性机制的明确,分子检测技术被广泛应用于抗性频率的检测,比如突变阻滞扩增系统 (ARMS)、PCR-RFLP 等^[14-17]。本实验室在前期工作中,根据已报道的引起烯酰吗啉抗性的突变位点,开发了 Tetra-primer ARMS PCR 检测方法,在一个反应中运用两对特异引物进行扩增,通过扩增的片段大小来区分抗性菌株和敏感菌株的等位基因,该方法快速简单,精确省时,并且通过叶盘法进行验证,准确率达到 100%^[9]。

烯酰吗啉属于低中等抗性风险的药剂,抗烯酰吗啉菌株出现后,若连续单独使用羧酸酰胺类杀菌剂数年,抗性频率将急剧上升至近 100%,其防效可

能会完全丧失,但停止使用两年后,抗性频率会迅速下降。因此抗药性监测是指导此类杀菌剂的合理使用,对抗性群体进行有效治理以延长杀菌剂使用寿命的有效手段。本试验所用的 60 株菌株中,检测到一株抗性菌株,且未出现杂合菌株,表明该地区存在对烯酰吗啉具有抗性的菌株。这一结果说明在此地区,烯酰吗啉仍然具有优秀的防效,推荐作为霜霉病的防治药剂。对于抗性菌株的出现,虽然抗性频率较低,并未影响烯酰吗啉的防效,但仍然应该引起足够重视,对抗性频率进行连续监测,在抗性频率上升时,及时采取轮换用药措施,防止抗性基因的扩展及抗性频率的进一步上升,以减少霜霉病造成的损失。

参考文献

- [1] WONG F P, BURR H N, WILCOX W F. Heterothallism in *Plasmopara viticola* [J]. Plant Pathology, 2001, 50(4): 427 - 432.
- [2] GESSLER C, PERTOT I, PERAZZOLLI M. *Plasmopara viticola*: a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management [J]. Phytopathologia Mediterranea, 2011, 50(1): 3 - 44.
- [3] 王忠跃. 中国葡萄病虫害与综合防控技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2009.
- [4] 朱书生, 卢晓红, 陈磊, 等. 羧酸酰胺类(CAAs)杀菌剂研究进展[J]. 农药学报, 2010, 12(1): 1 - 12.
- [5] LEROUX P, ELAD Y, WILLIAMSON B, et al. Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides [M]. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Springer Netherlands, 2007: 195 - 222.
- [6] BLUM M, WALDNER M, GISI U. A single point mutation in the novel PvCesA3 gene confers resistance to the carboxylic acid amide fungicide mandipropamid in *Plasmopara viticola* [J]. Fungal Genetics and Biology, 2010, 47(6): 499 - 510.
- [7] WONG F P, WILCOX W F. Distribution of baseline sensitivities to azoxystrobin among isolates of *Plasmopara viticola* [J]. Plant Disease, 2000, 84(3): 275 - 281.
- [8] AOKI Y, FURUYA S, SUZUKI S. Method for rapid detection of the PvCesA3 gene allele conferring resistance to mandipropamid, a carboxylic acid amide fungicide, in *Plasmopara viticola* populations [J]. Pest Management Science, 2011, 67(12): 1557 - 1561.
- [9] ZHANG Hao, KONG Fanfang, WANG Xina, et al. Tetra-Primer ARMS PCR for rapid detection and characterization of *Plasmopara viticola* phenotypes resistant to carboxylic acid amide (CAA) fungicides [J]. International Journal of Current Research, 2017, 2(5): 557 - 563.
- [10] CHABANE K, LEROUX P, MAIA N, et al. Resistance to dimethomorph in laboratory mutants of *Phytophthora parasitica* [C] // Modern fungicides and antifungal compounds, 11th international symposium. 1996: 387 - 391.
- [11] YOU FRANK M, HUO Naxin, GU Yongqiang, et al. BatchPrimer3: a high throughput web application for PCR and sequencing primer design [J]. BMC Bioinformatics, 2008, 9(1): 253.
- [12] 毕秋艳, 杨晓津, 马志强, 等. 葡萄霜霉病有效药剂筛选及药效评价[J]. 植物保护, 2014, 40(3): 199 - 203.
- [13] SUN Haiyan, WANG Hancheng, STAMMLER G, et al. Sensitivity of Chinese isolates of *Plasmopara viticola*, to metalaxyl and dimethomorph [J]. Journal of Phytopathology, 2010, 158(6): 450 - 452.
- [14] CHATZIDIMOPOULOS M, GANOPOULOS I, MADESES P, et al. High-resolution melting analysis for rapid detection and characterization of *Botrytis cinerea* phenotypes resistant to fenhexamid and boscalid [J]. Plant Pathology, 2014, 63(6): 1336 - 1343.
- [15] FURUYA S, SUZUKI S, KOBAYASHI H, et al. Rapid method for detecting resistance to a QoI fungicide in *Plasmopara viticola* populations [J]. Pest Management Science, 2009, 65(8): 840 - 843.
- [16] LIU Ye, CHEN Xiang, JIANG Jinhua, et al. Detection and dynamics of different carbendazim-resistance conferring β -tubulin variants of Gibberellazeae collected from infected wheat heads and rice stubble in China [J]. Pest Management Science, 2014, 70(8): 1228 - 1236.
- [17] LIU Xin, YIN Yanni, WU Jianbing, et al. Identification and characterization of carbendazim-resistant isolates of Gibberellazeae [J]. Plant Disease, 2010, 94(9): 1137 - 1142.

(责任编辑: 杨明丽)