

• 研究论文 •

抗苯醚菌酯 (ZJ0712) 小麦白粉病菌 突变体的诱导及其生物学特性

胡伟群*, 陈定花, 朱卫刚, 陈杰

(浙江省化工研究院, 国家南方农药创制中心浙江基地, 杭州 310023)

摘要: 经过药剂驯化 10 代后, 从对苯醚菌酯 (ZJ0712) 敏感的小麦白粉病菌 *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* 3 个菌株中获得 3 个抗药突变体, 突变体的抗性指数均大于 80, 且其抗性能够通过无性繁殖稳定遗传。室内接种试验发现, 突变体的致病力与亲本菌株无明显差异。细胞色素 b (cyt b) 基因片段序列分析发现, 突变体 cyt b 基因的第 143 位密码子均由敏感菌株的 GGT (丙氨酸) 突变成了 GCT (甘氨酸)。研究结果表明, 小麦白粉病菌对苯醚菌酯存在较高的抗性风险, 该药剂在使用过程中需注意采取相应的抗性治理措施, 以延缓抗性发生。

关键词: 小麦白粉病菌; 苯醚菌酯 (ZJ0712); 抗药性; 抗药突变体

中图分类号: S481.4 文献标志码: A 文章编号: 1008-7303(2009)02-0203-05

Induction and Characteristics of Fungicide ZJ0712-resistant *Blumeria graminis* Mutants

HU Wei-qun*, CHEN Ding-hua, ZHU Wei-gang, CHEN Jie

(Zhejiang Chemical Industry Research Institute, Zhejiang Branch of National Pesticide
R & D South Center, Hangzhou 310023, China)

Abstract Three fungicide ZJ0712-resistant *B. graminis* f. sp. *tritici* (Bgt) mutants Bgt01R, Bgt1-IR and Bgt2-IR were obtained from the sensitive isolates Bgt01, Bgt1-1 and Bgt2-1, respectively by the method of adaptation fungicide for ten generations. The resistance factors of all three mutants to ZJ0712 were greater than 80, and the resistance were stable through asexual reproduction. Inoculation tests showed that the virulence of the mutants was not significantly different from that of their parents. Comparisons of the nucleotide sequence of the partial cytochrome b (cyt b) gene from sensitive isolates and resistant mutants revealed that all three resistant mutants had a single point mutation of GGT (in sensitive isolates) to GCT (in resistant mutants), which caused a change of glycine (Gly) to an alanine (Ala) at codon position 143 (G143A) of the cyt b. The results indicated that the Bgt has a high risk of developing resistance to ZJ0712. In order to delay the development of ZJ0712 resistance in Bgt populations, effective anti-resistance strategies are needed when the fungicide is applied widely in fields.

Key words *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*; ZJ0712; fungicide resistance; resistant mutant

收稿日期: 2008-11-24 修回日期: 2009-01-15
作者简介: * 胡伟群 (1972-), 女, 通讯作者 (Author for correspondence), 浙江金华人, 助理研究员, 主要从事新农药创制的生物测试研究。
联系电话: 0571-85224293 E-mail huweiqun@sohu.com
基金项目: “十一五”国家科技支撑计划项目 (2006BAE01A-03-7)。

由 *Blumeria graminis f. sp. tritici* 引起的小麦白粉病是一种世界性的病害, 几乎在所有小麦种植区都有发生。该病害在一般发生年份可使小麦减产 5% ~ 15%, 严重年份减产高达 30%。由于抗病品种种植一段时间后容易丧失抗性, 因此, 化学防治仍是该病害应急控制的重要措施之一。20 世纪 80 年代以来, 三唑酮一直是我国防治该病害的主要药剂, 但自 90 年代初我国首次报道白粉病菌对该类药剂产生抗性以后, 不少地区三唑酮的防效已明显下降^[1]。因此, 开发和推广应用新型高效杀菌剂对该病害的持续控制有着重要意义。

苯醚菌酯 (ZJ0712) 是浙江省化工研究院自主开发的新型甲氧基丙烯酸酯 (QoI) 类杀菌剂, 已获得国家发明专利 (ZL03120882.7) 和农药临时登记。已有研究表明, 该化合物对卵菌、子囊菌和半知菌等多种病菌有很高的杀菌活性, 尤其对作物白粉病和霜霉病有特效^[2]。

QoI 类杀菌剂主要作用于病菌的细胞色素 bc1 复合体, 从而抑制病菌的呼吸作用^[3]。以往的许多研究发现, 一些植物病原菌 (如白粉病菌、霜霉病菌 *Pseudoperonospora cubensis*, 链格孢病菌 *Alternaria alternata*) 容易对 QoI 类杀菌剂产生抗性^[4]。例如, 1996 年啞菌酯在德国开始用于防治麦类白粉病, 1998 年就发现了其抗性菌株^[5]; 1997 年醚菌酯在日本注册用于防治黄瓜白粉病和霜霉病, 两年后也出现了抗性^[6]。根据国际杀菌剂行动委员会 (Fungicide Resistance Action Committee, FRAC) 的最新统计, 已有 24 种植物病原菌对 QoI 类杀菌剂产生了抗性。苯醚菌酯目前尚未在小麦上大面积推广应用, 为此, 本研究通过室内诱导获得抗苯醚菌酯的小麦白粉病菌突变体, 并研究了抗药突变体的生物学特性。该研究结果对合理用药、延长苯醚菌酯的使用寿命将有重要意义。

1 材料与方法

1.1 供试药剂

95% 的苯醚菌酯 (ZJ0712) 原药和 95% 的三唑酮 (triadimenfon) 原药均由国家南方农药创制中心浙江基地合成所提供, 以丙酮为溶剂, 分别配制成 10 mg/mL 母液, 置于 4℃ 冰箱中备用。施用后再

分别用无菌水稀释, 并加入体积分数为 0.05% 的吐温-80。

1.2 供试菌株及小麦

抗三唑酮的小麦白粉病菌 (*B. graminis f. sp. tritici*) Bgt1-1 和 Bgt2-1 菌株由浙江大学生物技术研究所提供; 对三唑酮敏感的 Bgt01 菌株由国家南方农药创制中心浙江基地生物测试研究所保存。

供试小麦品种为扬麦 5 号, 市售。

1.3 白粉病菌对苯醚菌酯的敏感性测定

选择 2~3 叶期、长势一致的盆栽麦苗 (盆钵直径 15 cm, 每盆 20 株左右), 用 YW52-A 型微型喷雾器 (压力 0.1 MPa) 分别将浓度为 40、20、10、5、2.5、1.25 和 0.625 mg/L 的苯醚菌酯水溶液均匀喷洒于小麦叶片表面, 以喷无菌水 (加入体积分数为 0.05% 的吐温-80, 下同) 的处理为对照。每一浓度设 5 个重复 (每菌株 5 盆苗), 喷药后自然晾干。药剂处理 24 h 后, 用接种喷雾器 (压力 0.1 MPa) 将新鲜的白粉病菌孢子悬浮液 (浓度为每 1 mL 含 1×10^5 个孢子) 均匀喷洒于小麦叶片上。分别用直径 20 cm 的玻璃罩将每个盆钵罩住, 玻璃罩顶端用 4 层纱布封好, 避免菌株之间的交叉污染。将接种后的麦苗移至人工气候室中 (相对湿度 70% ~ 80%, 温度 20℃, 光暗周期为 14 h / 10 h 下同)。培养 8 d 后调查发病情况, 按照文献 [7] 的分级标准进行分级, 计算病情指数, 利用 DPS 软件计算每个菌株对苯醚菌酯的 EC₅₀ 值。该试验重复 3 次。结果用 SAS (Version 8.01 SAS Institute, Cary, NC, USA) 软件进行统计分析。

1.4 白粉病菌对三唑酮的敏感性测定

按 1.3 节所述方法分别将浓度为 200、50、12.5、3.125 和 0.781 mg/L 的三唑酮溶液均匀喷洒在 2~3 叶期的小麦叶片上, 同时以喷水的处理为对照。喷药 24 h 后, 测定每个菌株对三唑酮的 EC₅₀ 值, 试验重复 3 次。

1.5 抗药性突变体的诱导

选择 2~3 叶期、长势均匀一致的盆栽小麦苗, 按 1.3 节施药方法将浓度为 5 mg/L 的苯醚菌酯水溶液均匀喷洒于小麦叶片上, 施药后 24 h, 分别接种新鲜的白粉病菌 Bgt01、Bgt1-1、Bgt2-1 菌株孢子悬浮液 (每 1 mL 含 1×10^5 个孢子)。接种后麦苗置于人工气候室内培养 8 d 后, 将每个菌株新产生的孢子再接种到新鲜的经苯醚菌酯处理过的

小麦叶片上, 每 8 d 转接 1 代, 每代所用苯醚菌酯的浓度逐次增加 5 mg/L。连续接种 10 代后, 从每个菌种中分离出一个单孢子堆的突变体, 并在经 50 mg/L 苯醚菌酯处理后的小麦上扩繁, 按 1.3 和 1.4 节所述方法测定每个突变体对苯醚菌酯和三唑酮的敏感性。

1.6 抗药性突变体的抗药稳定性测定

将诱导获得的抗药性突变体在未用药剂处理过的小麦叶片上继代培养, 每 8 d 转接 1 代, 连续培养 10 代后, 按 1.3 和 1.4 节所述方法测定每个突变体对苯醚菌酯和三唑酮的敏感性。所用苯醚菌酯的浓度分别为 200、100、50、25、12.5 $\mu\text{g/mL}$, 所用三唑酮的浓度与 1.4 节中相同。

1.7 抗药性突变体致病力的测定

将抗药性突变体和亲本菌株孢子悬浮液 (每 1 mL 含 1×10^5 个孢子) 分别接种于 2~3 叶期的小麦叶片上, 接种后麦苗按 1.3 节所述方法培养 8 d 后, 调查叶片发病情况, 计算病情指数, 并利用 SAS 软件统计分析各抗药突变体菌株与其亲本菌株间致病力的差异。

1.8 抗药性突变体的细胞色素 b(cyt b) 基因序列分析

1.8.1 病菌 DNA 的提取 收集每一菌株/突变体的新鲜孢子 20 mg 置于 1.5 mL 的离心管中, 加入 100 μL (DNA 提取缓冲液 [DNA Extraction Buffer, 简称 DEB, 其成分为: 200 mol/L Tris-HCl, 50 mol/L EDTA, 200 mol/L NaCl 质量浓度为 1% 的 SDS]), 用带有磨头玻棒的电钻研磨孢子 1 min 后向管中加入 400 μL DEB, 室温静置 10 min 后于 12 000 g、4℃ 条件下离心 5 min, 将上清液转移至另一干净的离心管中, 加入 750 μL 无水乙醇, 混匀后于 12 000 g 离心 2 min, 将沉淀的 DNA 用 70% 乙醇洗涤, 最后溶于 100 μL 无菌水中, -20℃ 保存, 备用。

1.8.2 cytb 基因序列的扩增和测序 根据 GenBank 中小麦白粉病菌 cytb 的基因片段序列 (GenBank 登陆号为 AJ293566) 设计了一组 PCR 引物 BF (5'-CGTTACATACA CTCAAACACAGCTT-3') 和 BR (5'-TTGCATAGAAGGGCAGAAGA-3'), 利用该组引物可扩增出一条 610 bp 的 cytb 基因片段, 该片段序列包含了目前发现的所有可能与甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂抗性相关的突变位点。利用该组引物分别以上述提取的每个菌株或

突变体的 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增的反应体系 (50 μL) 为: ddH₂O 40.5 μL , 10 × Buffer 5 μL , dNTP (10 mmol/L) 1 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 的引物各 1 μL , DNA 模板 1 μL , Taq 酶 0.5 μL 。PCR 反应程序为: 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 40 s, 35 个循环; 最后于 72℃ 延伸 5 min, PCR 反应产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测后回收、纯化, 并连接到大连 TaKaRa 生物技术有限公司的 pMD18-T 质粒上, 然后挑取有外源片段的质粒由上海生物技术有限公司进行测序。测定的序列和翻译成的氨基酸序列用 Cluster W 软件进行比对分析。

2 结果与讨论

2.1 抗苯醚菌酯的小麦白粉病菌突变体的诱导

经过 10 代药剂驯化后, 从每个苯醚菌酯的敏感菌株中分别诱导分离出一个抗药性突变体, 敏感性测定发现, 所得突变体对苯醚菌酯表现出很高的抗性水平, 抗性指数均大于 80, 但对三唑酮的敏感性无显著变化 (表 1)。亲本菌株 Bgt1-1 和 Bgt2-1 对三唑酮表现为抗性, 经过苯醚菌酯诱导后, 可获得对三唑酮和苯醚菌酯具有双重抗性的突变体。表明小麦白粉病菌容易对苯醚菌酯产生抗性, 且对三唑酮具有抗性的白粉病菌可同时对苯醚菌酯产生抗性。王敏等^[8]的研究也发现, 采用药剂驯化方法很容易获得抗苯醚菌酯的黄瓜白粉病菌 *Sphaerotheca fuliginea*, 而且抗药突变体的抗药性能稳定遗传。这些结果表明, 植物白粉病菌对苯醚菌酯具有很高的抗药风险。

2.2 抗药性突变体的稳定性和致病力

研究发现, 抗药突变体的致病力与亲本菌株无显著差异 (图 1)。3 个苯醚菌酯抗药突变体在未用药剂处理的小麦叶片上继代培养 10 代后, 其对苯醚菌酯的 EC₅₀ 值无明显变化 ($P > 0.05$), 表明突变体对苯醚菌酯的抗药性能在无性后代中稳定遗传。因此, 一旦田间白粉病菌对苯醚菌酯产生抗性后, 即使停止使用苯醚菌酯, 抗药菌群仍有可能存活一段时间。

2.3 抗药性突变体 cytb 基因片段上的点突变

由 BF 和 BR 引物扩增出一条 610 bp 的 cytb 基因片段, 编码细胞色素 b 的第 79 至 282 位氨基酸。比较突变体和亲本菌株的线粒体 cytb 基因片

表 1 小麦白粉病菌突变体对苯醚菌酯和三唑酮的抗性

Table 1 Resistance of *B. graminis f. sp. tritici* mutants to ZJ0712 and triadimefon

突变体/亲本菌株 Mutants/parent isolates ^a	苯醚菌酯的抑制中浓度 EC ₅₀ of ZJ0712 /(μg/mL) ^b	对苯醚菌酯的抗性指数 Resistance factor to ZJ0712 ^c	三唑酮的抑制中浓度 EC ₅₀ of triadimefon /(μg/mL) ^b	对三唑酮的抗性指数 Resistance factor to triadimefon ^c
Bg01	1.52(±0.15)	—	1.52(±0.13)	—
Bg01R	146.30(±11.23)	96.25	1.60(±0.08)	1.05
Bgt1-1	1.46(±0.10)	—	81.88(±3.74)	—
Bgt1-1R	120.80(±12.04)	82.76	78.60(±6.91)	0.96
Bgt2-1	0.82(±0.17)	—	48.36(±3.49)	—
Bgt2-1R	153.20(±13.05)	186.93	53.20(±3.04)	1.10

注: ^a突变体 Bg01R、Bgt1-1R 和 Bgt2-1R 分别来源于亲本菌株 Bg01、Bgt1-1 和 Bgt2-1; ^b表中数据为 3 次试验结果的平均值(±标准差); ^c抗性指数 = 抗性突变体的 EC₅₀/亲本菌株的 EC₅₀。

Note: ^aThe mutants Bgt1-1R, Bgt1-1R, and Bgt2-1R were obtained from the parent isolates Bgt1-1, Bgt1-1, and Bgt2-1, respectively. ^bData in the columns are the average of three repeated experiments and standard errors are presented in the parentheses. ^cResistance factor = the EC₅₀ value of mutant/the EC₅₀ value of its parent

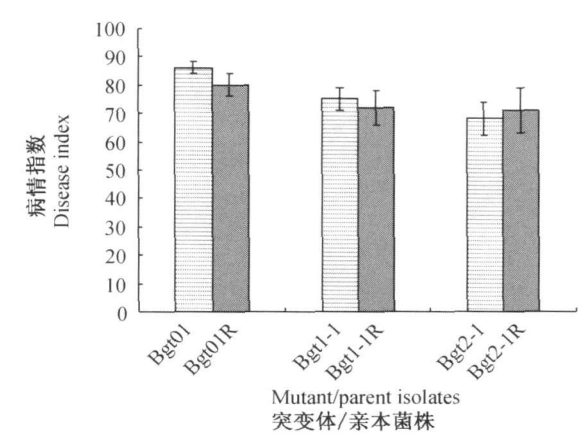


图 1 抗苯醚菌酯的小麦白粉病菌突变体 (Bg01R、Bgt1-1R、Bgt2-1R) 与其亲本菌株 (Bg01、Bgt1-1、Bgt2-1) 致病力的比较

Fig 1 Comparisons in virulence between the ZJ0712-resistant mutants (Bg01R, Bgt1-1R, Bgt2-1R) and their parental isolates (Bg01, Bgt1-1, Bgt2-1) of *B. graminis f. sp. tritici*

段序列发现, 3 个抗药突变体中 *cyt b* 第 143 位密码子均为 GCT(编码甘氨酸), 而该密码子在敏感菌株中为 GGT(编码丙氨酸)。该位点突变(G143A)与以往报道的抗咪菌酯的小麦白粉病菌的突变点相吻合^[5,9]。除了 G143A 位点突变以外, 所测定的 610 bp 的 *cyt b* 基因片段序列无其他改变。目前, 多数病原菌对 QoI 类杀菌剂的田间抗性均由 G143A 突变引起, 通常情况下, 该位点突变引起的抗性水平很高, 而且比较稳定^[4,10]。最近, Grasso 等^[11]研究发现, *cyt b* 基因第 143 位密码子后如果没有内含子, 则这些病菌很容易对 QoI

类杀菌剂产生抗性(例如白粉病菌); 相反, *cyt b* 基因第 143 位密码子后如果有内含子, 例如小麦条锈病(*Puccinia striiformis f. sp. tritici*) 和菜豆锈病(*Uromyces appendiculatus*), 这些病菌就不容易对该类药剂产生抗性。此外, 除了 G143A 位点突变外, *cyt b* 的第 129 位密码子上的 F129L 突变也可引起病菌对该类药剂产生抗性, 但抗性水平一般比较低。目前 F129L 点突变已在番茄早疫病(*Alternaria solani*)、葡萄霜霉病(*Plasmopara viticola*)、大麦网斑病(*Pyrenophorateres*)、黑麦草叶斑病(*Pyricularia grisea*)、瓜果腐霉病(*Pythium aphanidematum*) 等几种病原菌中被发现^[12,13]。本研究的小麦白粉病菌突变体中未发现该位点密码子的突变, 至于其他小麦白粉病菌是否可能发生第 129 密码子的突变还有待于进一步研究。

3 结论

室内药剂驯化能比较容易地获得抗苯醚菌酯的小麦白粉病菌突变体, 在室内接种条件下, 抗药突变体可保持正常的致病力和稳定的抗性水平, 表明小麦白粉病菌对苯醚菌酯存在较高的抗性风险, 因此在使用苯醚菌酯防治小麦白粉病时应注意采取必要的抗性治理措施。根据 FRAC 的建议, 使用 QoI 类药剂防治麦类病害时可采取如下措施以延缓抗性的发生发展: 1) 必须严格控制用药次数, 每个生长期最多不超过 2 次。2) 由于 QoI 类药剂与目前其他类杀菌剂之间未发现存在交互抗性, 因此, 可将 QoI 类药剂和其他作用方式不同的杀菌剂混用或轮用来防治白粉病。但是根据本

研究结果, 在白粉病菌对三唑酮存在抗性的地区, 建议不要将三唑类和 QoI 类药剂混用来防治白粉病, 以防止产生双重抗性。3) 严格按照规定剂量使用, 不可轻易降低剂量, 以免提供适宜的药剂选择压力, 增加抗性风险。4) QoI 类药剂应在病害发生初期使用, 避免在病害爆发流行后作为治疗剂使用。

参考文献:

[1] XIA Ye (夏烨), ZHOU Yi-lin (周益林), DUAN X i-yu (段霞瑜), et al. 小麦白粉病菌对烯炔菌酯的敏感基线及烯炔菌酯和三唑酮的交互抗性 [J]. Acta Phytopathologica Sinica (植物病理学报), 2004, 34(4): 382-384

[2] CHEN Ding-hua (陈定花), ZHU Wei-gang (朱卫刚), HU Wei-qun (胡伟群), et al. 新型广谱杀菌剂苯醚菌酯 (ZJ0712) 生物活性 [J]. Pesticides (农药), 2006, 45(1): 18-21.

[3] BARTLETT D W, CLOUGH J M, GODW N J R, et al The Strobilurin Fungicides [J]. Pest Management Science, 2002, 58: 649-662.

[4] MA Z, MICHA ILDES T J Advances in Understanding Molecular Mechanisms of Fungicide Resistance and Molecular Detection of Resistant Genotypes in Phytopathogenic Fungi [J]. Crop Protection, 2005 24: 853-863.

[5] SEROTZK IH, WULLSCHLEGER J G ISIU. Point Mutation in Cytochrome b Gene Conferring Resistance to Strobilurin Fungicides in Erysiphe graminis f sp tritici Field Isolates [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2000 68 107-112.

[6] ISHIIIH, FRAA IJE B A, SUG NYAMA T, et al Occurrence and Molecular Characterization of Strobilurin Resistance in Cucumber Powdery Mildew and Downy Mildew [J]. Phytopathology, 2001, 91: 1166-1171.

[7] The National Center for Research and Development of Pesticide (国家农药创制中心). Standard Operation Procedure (SOP) for Evaluation of the Biological Activity of New Pesticide-bioassay Methods for Evaluation of Fungicide Activity (创制农药生物活性评价标准操作程序. 杀菌剂生物活性测定方法) [C]. Beijing (北京), 2003 390-433.

[8] WANG M in (王敏), HAN Ping (韩平), LU Xiao-hong (卢晓红), et al 黄瓜白粉病菌对苯醚菌酯敏感基线的建立及室内抗药性风险评价 [J]. Acta Phytopathologica Sinica (植物病理学报), 2007, 37: 660-665

[9] FRAA IJE B A, BUTTERS JA, COELHO JM, et al Following the Dynamics of Strobilurin Resistance in Blumeria graminis f sp tritici Using Quantitative Allele-specific Real-time PCR Measurements with the Fluorescent Dye SYBR Green I [J]. Plant Pathology, 2002, 51: 45-54

[10] FERNÁNDEZ-ORTUÑO D, TORÉS JA, DE VICENTE A, et al. Mechanisms of Resistance to QoI Fungicides in Phytopathogenic Fungi [J]. International Microbiology, 2008 11: 1-9

[11] GRASSO V, PALERMO S, SIERO TZK IH, et al Cytochrome b Gene Structure and Consequences for Resistance to Qo Inhibitor Fungicides in Plant Pathogens [J]. Pest Management Science, 2006, 62: 465-472.

[12] PASCHE J S, GUDMESTAD N C. Prevalence, Competitive Fitness and Impact of the F129L Mutation in A lemaria Solani from the United States [J]. Crop Protection, 2008, 27: 427-435

[13] KIM Y, DKON EW, VINCELLIP, et al Field Resistance to Strobilurin (QoI) Fungicides in Pyricularia grisea Caused by Mutations in Mitochondrial Cytochrome b Gene [J]. Phytopathology, 2003, 93: 891-900.

(Ed TANG J)

• 专利介绍 •

专利名称: 新型杂环杀菌剂及其组合物
专利申请号: CN 200710056434.3 公开号: CN101091490
申请日: 2007. 01. 12 公开日: 2007. 12. 26 申请人: 南开大学

本发明详细研究了噻酰胺和甲噻酰胺的杀菌谱以及初步的杀菌作用部位; 提供了噻酰胺和甲噻酰胺杀菌剂单剂的加工方法及其与常规杀菌剂和杀虫剂复配制剂的加工方法; 提供了噻酰胺和甲噻酰胺杀菌剂单剂及其与常规杀菌剂和杀虫剂复配制剂的药效评价和比较。研究发现, 噻酰胺和甲噻酰胺的杀菌谱较甲霜灵广, 防治效果优于甲霜灵, 其杀菌作用的初步作用位点是抑制孢子萌发。噻酰胺和甲噻酰胺与常规杀菌剂复配使用田间防治效果好。本发明公开了噻酰胺和甲噻酰胺的杀菌活性及其与杀菌剂和杀虫剂组合物的杀菌活性。

(王元荪 供稿)