

# 灰葡萄孢琥珀酸脱氢酶抑制剂类杀菌剂抗性的等位基因特异性 PCR 快速检测

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

刘梦晴, 屠紫娟, 余洋, 杨宇衡, 方安菲, 田斌年, 王静, 毕朝位. 灰葡萄孢琥珀酸脱氢酶抑制剂类杀菌剂抗性的等位基因特异性 PCR 快速检测[J]. 微生物学通报, 2025, 52(6): 2844-2853.

LIU Mengqing, TU Zijuan, YU Yang, YANG Yuheng, FANG Anfei, TIAN Binnian, WANG Jing, BI Chaowei. Rapid allele-specific PCR detection of *Botrytis cinerea* strains with resistance to succinate dehydrogenase inhibitors[J]. Microbiology China, 2025, 52(6): 2844-2853.

**摘要:**【背景】灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)是引起植物灰霉病的病原菌, 严重威胁着各种重要经济作物的产量。化学防治是最有效的一种防治措施, 其中, 琥珀酸脱氢酶抑制剂类(succinate dehydrogenase inhibitor, SDHI)杀菌剂是防治灰霉病的一类常用杀菌剂, 但目前灰葡萄孢已对其产生抗性。【目的】建立一种能快速检测对 SDHI 杀菌剂产生抗性的灰葡萄孢菌株的方法。【方法】以 SdhB<sup>P225F</sup> 点突变为材料, 通过设计特异性引物, 优化 PCR 体系退火温度和内参引物浓度、评价等位基因特异性 PCR (allele-specific PCR, AS-PCR) 的灵敏度和特异稳定性, 最后以快速提取的田间菌株的 DNA 为模板进行 AS-PCR 检测, 并将检测结果与测序结果进行比对。【结果】AS-PCR 引物对 P225F-3F/P225F-R 在退火温度为 58 °C, 内参引物浓度为 2.5 μmol/L 时可稳定区分抗性和敏感菌株, 灵敏度为 10 fg/μL, 粗提田间菌株的 AS-PCR 检测结果与测序结果一致。【结论】该 AS-PCR 检测方法操作简单、灵敏度高、特异性强, 可为田间灰葡萄孢对 SDHI 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; 琥珀酸脱氢酶抑制剂类; 等位基因特异性 PCR; 抗药性

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFD1400901); 宜宾市双城协议保障科研经费(XNDX2022020011); 国家自然科学基金(31871990)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFD1400901), the Yibin Double City Agreement Guarantees Research Funding (XNDX2022020011), and the National Natural Science Foundation of China (31871990).

\*Corresponding author. E-mail: chwbi@swu.edu.cn

Received: 2024-09-15; Accepted: 2024-11-16; Published online: 2024-12-16

## Rapid allele-specific PCR detection of *Botrytis cinerea* strains with resistance to succinate dehydrogenase inhibitors

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>

1 Yibin Academy of Southwest University, Southwest University, Yibin 644000, Sichuan, China

2 College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400715, China

**Abstract:** [Background] *Botrytis cinerea* is a pathogen causing gray mold, posing a serious threat to the yields of various important economic crops. Chemical control is an effective prevention and control measure, and succinate dehydrogenase inhibitor (SDHI) are commonly used fungicides for controlling gray mold. However, *B. cinerea* has developed resistance to SDHI. [Objective] To establish a method for rapidly detecting *B. cinerea* strains with resistance to SDHI. [Methods] We designed specific primers based on the point mutation SdhB<sup>P225F</sup> and optimized the annealing temperature and internal reference primer concentration of the PCR system. We then evaluated the sensitivity, specificity, and stability of allele-specific PCR (AS-PCR). Finally, AS-PCR detection with rapidly extracted DNA from field strains as templates was conducted, and the detection results were compared with sequencing results. [Results] The AS-PCR with primers P225F-3F/P225F-R stably distinguished between resistant and sensitive strains at an annealing temperature of 58 °C and an internal reference primer concentration of 2.5 μmol/L, with the sensitivity of 10 fg/μL. The AS-PCR detection results of strains in the field were consistent with the sequencing results. [Conclusion] The AS-PCR detection method has simple operation, high sensitivity, and strong specificity, serving as a feasible method for rapid detection of *B. cinerea* strains with resistance to SDHI in the field.

**Keywords:** *Botrytis cinerea*; succinate dehydrogenase inhibitor (SDHI); allele-specific PCR; drug resistance

灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)可以引起灰霉病的发生,在植物整个生育期皆可发病,其寄主范围广泛,低温高湿条件下灰霉病加重,并伴有灰色霉层产生,发病面积扩大,严重影响经济作物的产量与质量<sup>[1-3]</sup>。

灰霉病的防治主要以选育抗病品种和化学防治为主,但由于抗病品种选育难度大,化学防治仍是最常用的措施。化学防治中常用的杀菌剂有苯胺基嘧啶类、苯并咪唑类、二甲酰亚胺类和琥珀酸脱氢酶抑制剂类(succinate dehydrogenase inhibitor, SDHI)等<sup>[4-5]</sup>。由于灰葡萄孢具有寄生适合度高、遗传变异强及繁殖快

速等特点,加上杀菌剂的大面积频繁使用,使得其抗药性问题也日益凸显;目前,灰葡萄孢已对多种类型的杀菌剂产生了严重的抗性<sup>[6]</sup>。

SDHI 杀菌剂是一种内吸性杀菌剂,代表性种类主要有氟唑菌酰胺、氟吡菌酰胺和啉酰菌胺等,该类杀菌剂最早的品种是 1967 年生产的萎锈灵,但该药剂防治范围较窄<sup>[7]</sup>。2003 年上市的啉酰菌胺是目前使用量最大、杀菌谱较广的 SDHI 杀菌剂,对灰霉病的防治效果优异<sup>[8]</sup>。氟唑菌酰胺具有高效、防治范围广、持效期长等特点,对灰葡萄孢引起的病害具有特效<sup>[9]</sup>。但由于该类药剂普遍大量使用且其作用位点比

较单一,灰葡萄孢已经对该类杀菌剂产生了抗药性,如2014年西班牙地区灰葡萄孢对啮酰菌胺抗性频率为7.6%<sup>[10]</sup>,2015年意大利地区抗性频率高达59%<sup>[11]</sup>,在我国上海、江苏和重庆的抗性频率分别达到29.74%、42.6%和92.25%<sup>[12-14]</sup>。

SDHI 杀菌剂通过作用于病原菌电子呼吸传递链中的复合物II(琥珀酸脱氢酶复合体)抑制植物病原真菌泛醌还原酶的活性使电子传递受到干扰,从而阻碍病原菌的生长和ATP的合成<sup>[15]</sup>。琥珀酸脱氢酶由4个亚基(A, B, C, D)组成,泛醌的结合位点位于由B、C、D亚基形成的疏水结构域中,该结构域中及附近氨基酸的替换会影响杀菌剂与琥珀酸脱氢酶的结合能力,从而导致抗药性的产生<sup>[16-17]</sup>。在灰葡萄孢中,SdhB亚基中已报道的突变方式有P225F/T/L、N230I和H272R/L/Y,SdhD亚基有H132R,这些位点的突变导致了灰葡萄孢对啮酰菌胺不同程度的抗性<sup>[18-20]</sup>。有报道显示,SdhC亚基的不同亚型也可能导致抗性<sup>[21-22]</sup>,但还需要进一步探究来证明。重庆地区灰葡萄孢对该药剂抗性SdhB<sup>P225F</sup>点突变占53.3%,为主要的抗性突变方式<sup>[14]</sup>。

为了及时发现和处理病原菌对杀菌剂的抗药性问题,进行植物病原真菌抗药性检测是必要的,因此,掌握病原菌抗药性的快速检测方法也显得尤为重要。传统方法检测周期长、操作烦琐<sup>[23-26]</sup>,而分子检测方法具有高效、操作简单等优点。其中,等位基因特异性PCR(allele-specific PCR, AS-PCR)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、剪异性强、成本相对较低。Ma等<sup>[27]</sup>、罗梅等<sup>[28]</sup>和郭东锋等<sup>[29]</sup>利用该技术成功检测了桃褐腐病菌(*Monilinia fructicola*)对苯并咪唑、多菌灵,以及马铃薯晚疫病菌(*Phytophthora infestans*)对甲霜灵的抗性菌株,同时,也有研究者成功检测了灰葡萄孢的Quinone outside inhibitor (QoIs)类抗性群体<sup>[30]</sup>。本研究基于灰葡萄孢SDHI抗性突变靶标SdhB<sup>P225F</sup>点突变,建立一种可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

检测,以期在实践中检测灰葡萄孢对SDHI杀菌剂抗性菌株提供更为便利和快速的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品

SDHI 抗性SdhB<sup>P225F</sup>点突变菌株B10、B27、B31、CS3和B1,SDHI敏感菌株B05.10、B8、B4、B7和LP1,本实验室保存;田间检测灰霉病菌样本为重庆市北碚区本勋农业园采集。

### 1.2 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂培养基参考文献[31]配制。

### 1.3 主要试剂和仪器

2×Taq Master Mix、NaOH,成都市科隆化学有限公司;Tris-HCl缓冲液(pH 8.0),Coolaber公司。全自动样品快速研磨仪,上海净信实业发展有限公司;核酸浓度测定仪,成都立德赛科技有限公司;PCR仪、电泳仪、凝胶成像仪、净化工作台,Bio-Rad公司。

### 1.4 AS-PCR引物设计

根据抗性菌株SdhB<sup>P225F</sup>(突变位置见图1)设计引物,对相应的突变方式分别设计相应的正向剪异性引物,将突变位点设计在正向引物的3'末端,在突变点前后1-2个碱基处设计错配进而提高引物的剪异性,引物序列如表1所示。以CTAB法<sup>[32]</sup>提取的灰葡萄孢敏感菌株和SdhB<sup>P225F</sup>点突变菌株的DNA为模板进行扩增BosI基因片段,扩增PCR产物预期大小为251 bp。

### 1.5 AS-PCR反应退火温度的确定

为在上述设计的引物中筛选出能够剪异性扩增出抗性菌株的引物对,同时确定每对引物的最适退火温度,分别以SdhB<sup>P225F</sup>点突变菌株B10和标准菌株B05.10的DNA为模板进行扩增。每组引物设置8个(52、54、56、58、59、61、63和65℃)退火温度进行PCR扩增。反应体系:DNA模板约70 ng,正、反向引物(表1)(10 μmol/L)各1 μL,2×Taq Master Mix 12.5 μL,ddH<sub>2</sub>O补足25 μL。反应条件:95℃ 3 min;95℃ 30 s,退火30 s,72℃ 1 min,共34次循环;

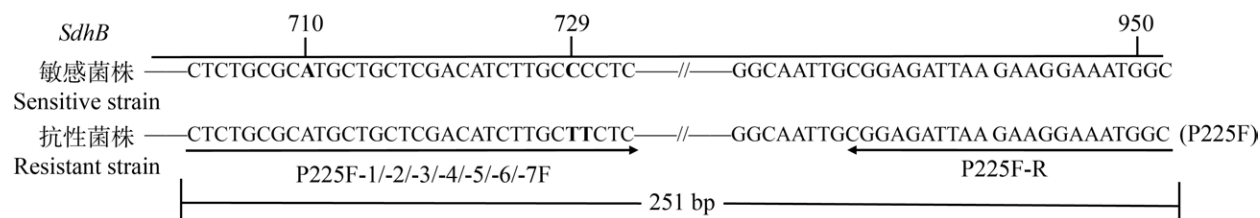


图 1 AS-PCR 引物设计模式图

Figure 1 AS-PCR primer design model.

表 1 根据 P225F 核苷酸突变位点设计的 AS-PCR 引物

Table 1 AS-PCR primers were designed based on P225F nucleotide mutation site

| 引物       | 序列                              |
|----------|---------------------------------|
| Primer   | Sequence (5'→3')                |
| P225F-1F | CTCTGCGCATGCTGCTCGACATCTTGCTT   |
| P225F-2F | CTCTGCGCATGCTGCTCGACATCTTGCTTG  |
| P225F-3F | CTCTGCGCATGCTGCTCGACATCTTGCTTT  |
| P225F-4F | CTCTGCGCATGCTGCTCGACATCTTGCTTA  |
| P225F-5F | CTCTGCGCATGCTGCTCGACATCTTGCTTCA |
| P225F-6F | CTCTGCGCATGCTGCTCGACATCTTGCTTCC |
| P225F-7F | CTCTGCGCATGCTGCTCGACATCTTGCTTCC |
| P225F-R  | GCCATTTCCTTCTTAATCTCCGA         |
| ITS1     | CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA          |
| ITS4     | TCCTCCGCTTATTGATATGC            |

加粗为突变碱基；划线为错配碱基。

Bold represent mutated bases; Underlined represent mismatched bases.

72 °C 10 min. PCR 反应后用 1%琼脂凝胶电泳并记录结果。

## 1.6 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，本研究引入通用引物作为内参进行多重 AS-PCR 扩增。通用引物选用真菌的通用 ITS 引物 ITS1/ITS4 (表 1)。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、5、2.5 和 2 μmol/L。反应体系同 1.5，反应条件中退火温度为最适退火温度。

## 1.7 多重 AS-PCR 反应体系灵敏度的检测

将提取的抗性菌株 DNA 模板分布梯度稀

释为原浓度(100 ng/μL)的  $10^0$ – $10^{-16}$ 。得到 17 个 DNA 浓度梯度并进行 AS-PCR 反应灵敏度检测。反应体系和反应条件同 1.6。

## 1.8 AS-PCR 检测体系的验证

本研究采用实验室保存菌株进行检测体系的验证，即 P225F 突变方式抗性菌株 B27、B31、CS3 和 B1，以及敏感菌株 B8、B4、B7 和 LP1 的 DNA 为模板，反应体系和反应条件同 1.6。

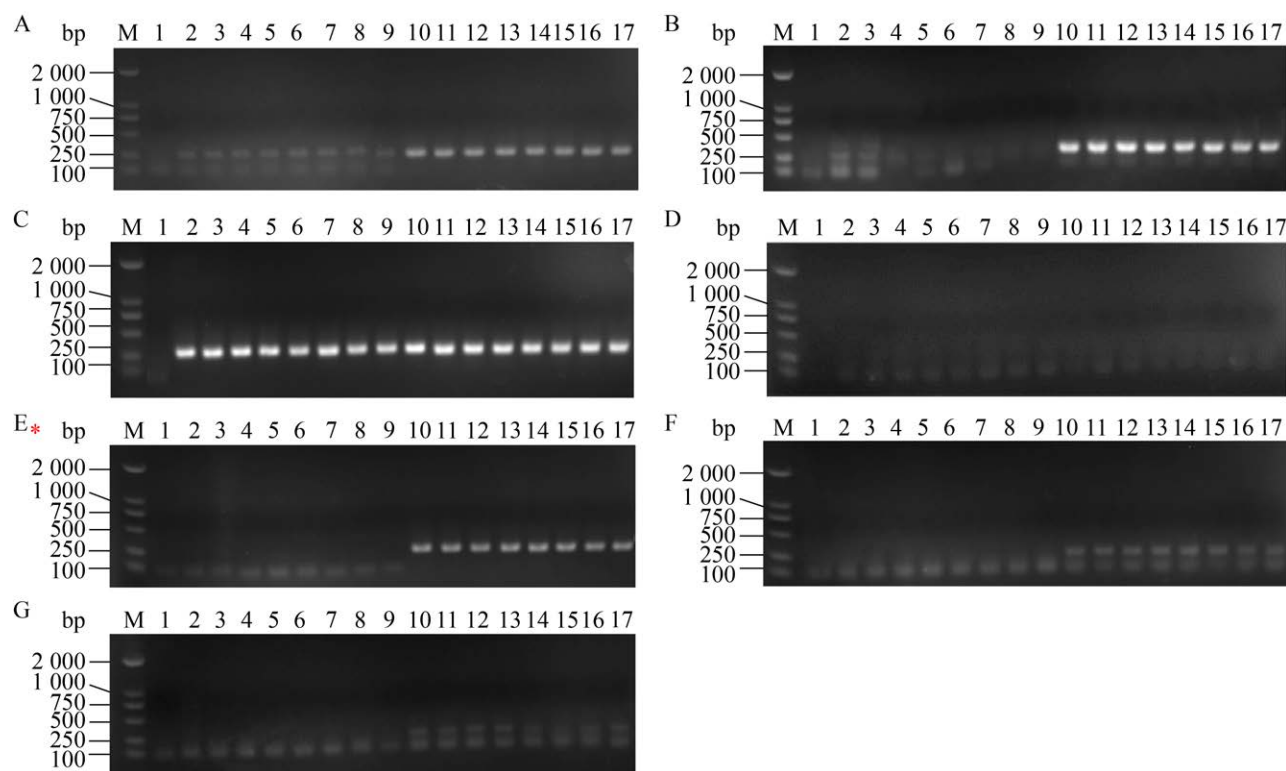
## 1.9 AS-PCR 检测体系的田间应用

挑取在重庆市北碚区采集的草莓灰霉病病果表面的菌丝和孢子，采用 NaOH 裂解法<sup>[33]</sup>直接快速提取病原菌 DNA，反应体系中 DNA 量相应改为 8 μL，其他成分和反应条件同 1.6。将 AS-PCR 检测结果为阳性的部分菌株 PCR 扩增的 *SdhB* 基因产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序，将测序结果翻译成蛋白序列，利用 DNAMAN 软件与 NCBI 中标准菌株 B05.10 进行氨基酸比对。

# 2 结果与分析

## 2.1 AS-PCR 特异性引物

利用根据突变位点设计的 7 对引物，分别以 P225F 抗性菌株 B10 和标准菌株 B05.10 的 DNA 为模板进行 PCR 扩增，扩增结果各不相同，其中引物对 P225F-1F/P225F-R、P225F-5F/P225F-R 和 P225F-6F/P225F-R 在敏感菌株为模板的条件下仍能扩增出条带(图 2A–2C)，引物对 P225F-4F/P225F-R 在抗性和敏感菌株为模板的条件下均不能扩增出条带(图 2D)，引物对 P225F-3F/P225F-R (图 2E)、P225F-2F/P225F-R



**图2 检测灰葡萄孢 P225F 突变方式特异性引物筛选电泳图** A-G 引物对分别为 P225F-1F/P225F-R、P225F-5F/P225F-R、P225F-6F/P225F-R、P225F-4F/P225F-R、P225F-3F/P225F-R、P225F-2F/P225F-R 和 P225F-7F/P225F-R。\*图表示成功检测 P225F 点突变的特异性引物。M: DL2000 DNA marker; 1: ddH<sub>2</sub>O 对照; 2-9: B05.10 DNA 为模板; 10-17: B10 DNA 为模板。

Figure 2 Screening of specific primers for detecting P225F mutation mode in *Botrytis cinerea* using electrophoresis map. The A-G primer pairs are P225F-1F/P225F-R, P225F-5F/P225F-R, P225F-6F/P225F-R, P225F-4F/P225F-R, P225F-3F/P225F-R, P225F-2F/P225F-R, and P225F-7F/P225F-R. \*: The figure shows the specific primers for successfully detecting the P225F point mutation. M: DL2000 DNA marker; 1: ddH<sub>2</sub>O control; 2-9: Sensitive strain B05.10 DNA as template; 10-17: Resistant strain B10 DNA as template.

和 P225F-7F/P225F-R (图 2F、2G)均只能在以抗性菌株为模板条件下才可以扩增出条带,但后两者条带较浅,说明该引物扩增效率低。综上,最终选择 P225F-3F/P225F-R 引物进行后续优化实验。

## 2.2 最适退火温度

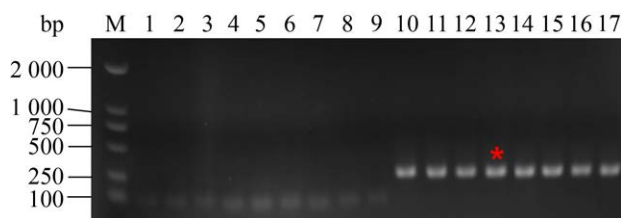
以 P225F 抗性菌株 B10 和敏感菌株 B05.10 的 DNA 为模板,利用引物对 P225F-3F/P225F-R 在不同退火温度下进行扩增,电泳检测结果如图 3 所示,在退火温度为 52-65 °C 时均能扩增出条带,不同温度下条带亮度相差不大,所以选择中间温度值即 58 °C 进行后续实验。

## 2.3 多重 AS-PCR 内参引物浓度

选用 ITS1/ITS4 作为内参进行并利用其与特异性引物进行多重 AS-PCR 扩增,当内参引物与特异性引物浓度比例为 1:5 时,敏感菌株扩增出的内参条带较微弱,但当比例为 1:4 时,敏感和抗性菌株内参条带扩增条带较亮且更加稳定(图 4),所以最终确定内参引物与特异性引物浓度比例为 1:4,即内参引物浓度为 2.5 μmol/L。

## 2.4 多重 AS-PCR 的灵敏度

将抗性菌株模板(100 ng/μL)梯度稀释后进行扩增,电泳结果见图 5,由图 5 可知,在稀释度为 10<sup>-7</sup> 时仍能扩增出特异性条带,即引物对



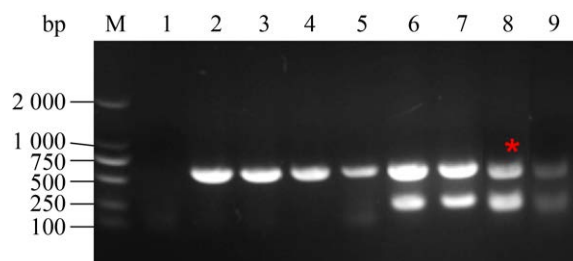
**图 3 成功检测灰葡萄孢 P225F 突变方式电泳图** 引物对为 P225F-3F/P225F-R。\*表示检测 P225F 特异性引物最适退火温度。M: DL2000 DNA marker; 1: ddH<sub>2</sub>O 对照; 2-9: B05.10 DNA 为模板, 退火温度分别为 52、54、56、58、59、61、63 和 65 °C; 10-17: B10 DNA 为模板, 退火温度为 52、54、56、58、59、61、63 和 65 °C。

Figure 3 Electrophoretic patterns of *B. cinerea* P225F mutations were successfully detected. Primer pairs are P225F-3F/P225F-R. \* indicates the optimal annealing temperature for detecting P225F specific primers. M: DL2000 DNA marker; 1: ddH<sub>2</sub>O control; 2-9: The DNA of the sensitive strains was used as the template, and the annealing temperatures were 52, 54, 56, 58, 59, 61, 63 and 65 °C, respectively; 10-17: The resistant strain DNA was used as the template, and the annealing temperatures were 52, 54, 56, 58, 59, 61, 63 and 65 °C.

P225F-3F/P225F-R 的灵敏度达 10 fg/μL, 说明该引物的灵敏度高。

## 2.5 验证 AS-PCR 检测体系

本研究分别选用敏感菌株 B8、B4、B7、LP1 和抗性 P225F 点突变菌株 B27、B31、CS3、B1



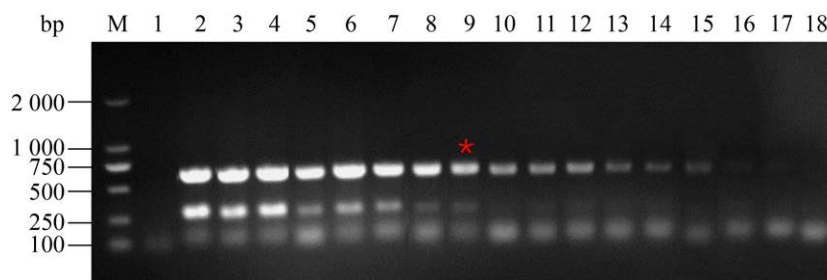
**图 4 内参引物浓度筛选** \*表示特异性与内参引物的最适浓度比例。M: DL2000 DNA marker; 1: ddH<sub>2</sub>O 对照; 2-5: 模板均为敏感菌株; 6-9: 模板为抗性菌株且内参引物与特异性浓度比例分别为 1:1、1:2、1:4 和 1:5。

Figure 4 Internal reference primer concentration screening. \* indicates the optimal concentration ratio of specificity to internal reference primers. M: DL2000 DNA marker; 1: ddH<sub>2</sub>O control; 2-5: All templates were sensitive strains; 6-9: The template was resistant strain and the ratio of internal reference primers to specific concentrations is 1:1, 1:2, 1:4 and 1:5.

检测引物特异性和稳定性, 电泳结果见图 6。由图 6 可知, 在以抗性菌株为模板的条件下均能扩增出 2 条带, 以敏感菌株为模板只能扩增出 1 条带, 说明该体系能够区分抗性和敏感菌株。

## 2.6 田间应用 AS-PCR 检测体系

将田间采集的样本取样 23 个并用粗提 DNA 为模板进行 PCR 检测, 发现其中 10 个样本



**图 5 灰葡萄孢对琥珀酸脱氢酶类杀菌剂抗性 AS-PCR 检测体系的灵敏度检测** \*表示该体系下可检测出抗性菌株最低 DNA 浓度。M: DL2000 DNA marker; 1: ddH<sub>2</sub>O 对照; 2-18: 稀释度为 10<sup>0</sup>-10<sup>-16</sup>。  
Figure 5 Detection of sensitivity of *B. cinerea* to SDHI resistance by AS-PCR. \* indicates the lowest DNA concentration that can detect resistant strains in this system. M: DL2000 DNA marker; 1: ddH<sub>2</sub>O control; 2-18: Dilution of 10<sup>0</sup>-10<sup>-16</sup>.

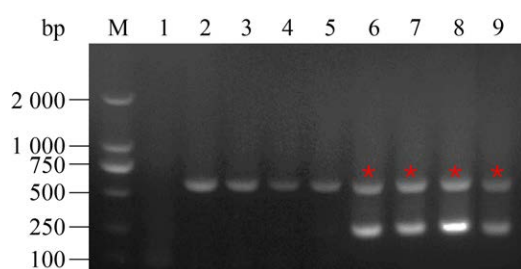


图 6 同种间灰葡萄对琥珀酸脱氢酶抑制剂杀菌剂抗性 AS-PCR 检测体系的特异性检测 \*表示在该反应体系下检测出的抗性菌株。M: DL2000 DNA marker; 1: ddH<sub>2</sub>O 对照; 2-5: 模板为敏感菌株 B8、B4、B7 和 LP1; 6-9: 模板为抗性菌株 B27、B31、CS3 和 B1。

Figure 6 Specific detection of AS-PCR system for resistance to SDHI in *B. cinerea*. \* indicate the resistant strains detected in the reaction system. M: DL2000 DNA marker; 1: ddH<sub>2</sub>O control; 2-5: The templates were sensitive strains B8, B4, B7 and LP1; 6-9: The templates were resistant strains B27, B31, CS3 and B1.

可以在 P225F 检测体系中检测出 2 条 PCR 产物 (图 7), 抗性菌株比例为 43.5%, 说明这 10 株样本中可能为 P225F 突变方式抗性菌株。扩增比

对 AS-PCR 检测为阳性的部分菌株的 *sdhB* 基因, 测序比对结果表明其抗性突变方式为 P225F (图 7)。以上结果说明本 AS-PCR 检测体系可快速准确地应用于田间灰葡萄孢 SDHI 杀菌剂抗性检测。

### 3 讨论

化学防治是防治植物病害的重要手段, 目前, 灰霉病的防治也以化学防治为主, 但灰葡萄孢的抗药性是灰霉病治理的重要阻碍, 抗性检测技术的建立是防治的基础, 因此, 建立抗性检测技术是非常必要的。传统检测方法检测周期长、效率低, 分子检测方法提高了检测抗性频率的效率和准确率, 常用抗性分子检测方法有实时荧光定量 PCR、PCR-限制性片段长度多态性(PCR-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)和环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)等技术, 这些方法各有优缺点, 可根据具体情况进行选择。其中, 实时荧光定量 PCR 技术准确度高, 但仪器较精密且试剂比较昂贵; PCR-RFLP 技术需突

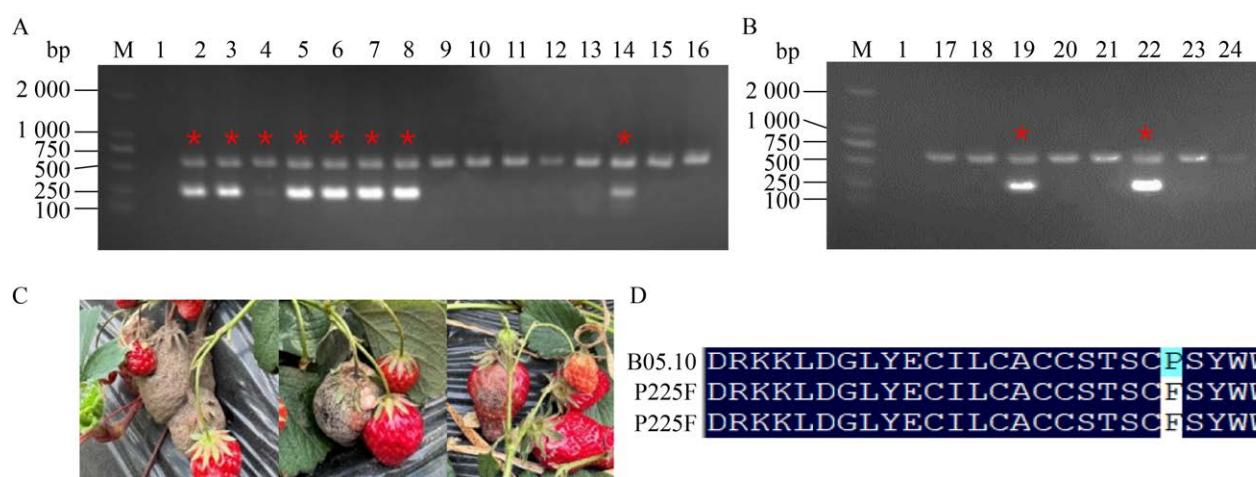


图 7 利用 AS-PCR 检测体系对田间菌株 P225F 突变方式进行检测 \*表示田间菌株在该体系下检测出抗性菌株。A-B 中 1 为 ddH<sub>2</sub>O 对照; 2-24 为 23 个田间菌株; C 为采集的田间样本; D 为 P225F 检测引物对扩增后的测序结果。

Figure 7 The mutation mode of field strain P225F was detected by AS-PCR. \* indicates that resistant strains have been detected in the field under this system. 1 in A-B is ddH<sub>2</sub>O control; 2-24 are 23 field strains; C is the collected field sample; D is the sequencing result of P225F detection primer pair amplification.

变点附近存在合适的酶切位点,应用于不同的突变位点具有局限性;LAMP 技术可在恒温条件下检测且结果可视化,但该技术假阳性干扰严重,引物设计困难。AS-PCR 技术具有通量高、操作便捷、灵敏度高、成本相对低等优点,如 Miles 等<sup>[34]</sup>利用该技术成功检测了白粉病菌对嘧菌酯的抗性菌株,罗梅等<sup>[28]</sup>检测了桃褐腐病菌对多菌灵的抗性菌株,郭东锋等<sup>[29]</sup>检测了马铃薯晚疫病菌对甲霜灵的抗性菌株, Ma 等<sup>[27]</sup>检测了桃褐腐病菌对苯并咪唑的抗性菌株。因此,我们选择 AS-PCR 技术建立灰葡萄孢抗性检测方法。

根据本实验前期研究发现,重庆地区的灰葡萄孢对 SDHI 抗性菌株的 B 亚基上突变方式包括 P225F、N230I、H272R,其中有 53.3%都为 SdhB<sup>P225F</sup> 点突变方式<sup>[22]</sup>,因此,本研究以 SdhB<sup>P225F</sup> 点突变菌株为材料,建立可快速检测灰葡萄孢对 SDHI 抗性的 AS-PCR 技术。

在设计 AS-PCR 引物时,需在其中一条引物的 3'末端对突变前后 1-2 个碱基进行错配,不同的错配碱基会影响扩增效率和特异性。在本研究中,当引物 CT 碱基不错配或错配为 CA 和 CC 时,敏感和抗性菌株为模板都能扩增出条带,说明该引物不能有效区分敏感和抗性菌株,特异性不够强;当 CT 错配为 AT 时,敏感菌株和抗性菌株均不能扩增出条带,说明该组引物根本不能扩增该基因片段;当 CT 错配为 TT、GT 和 CG 时,都只能在抗性菌株中扩增出条带,说明该引物特异性强,但后两者的扩增效率略低。综上,只有 CT 错配为 TT 时大大提升了检测特异性和扩增效率。

在进行体系优化时,引入真菌通用引物 ITS1/ITS4 作为内参,这样既能排除假阴性干扰,还可以节省试剂、DNA 模板等原料的使用。然而,鉴于不同引物在扩增效率上各不相同,并且在同一体系中同时扩增存在竞争关系,因此,在多重 PCR 扩增过程中,特异性引物和内

参引物浓度比例的调整显得尤为关键。当内参引物与特异性引物浓度比为 1:5 时,虽能在抗性菌株为模板扩增出 2 种条带,但扩增浓度较低,因此,本研究最终选择 1:4 作为最优比例,即内参引物浓度为 2.5  $\mu\text{mol/L}$ 。

最后,本研究将 CTAB 法提取 DNA 的方法替换为 NaOH 裂解法,将田间菌株在不进行分离纯化的条件下粗提 DNA 作为模板进行 PCR 检测,扩增出特异性条带的菌株为 SdhB<sup>P225F</sup> 点突变并且该检测结果与测序结果一致,即扩增出特异性条带的菌株为 P225F 突变方式,同时,说明该菌株为 SDHI 抗性菌株。最终确定引物对 P225F-3F/P225F-R 可有效地区分出 SDHI 杀菌剂 SdhB<sup>P225F</sup> 突变方式的抗性菌株。从而说明本方法能更方便、快速、准确地检测出田间抗药性菌株。

利用该 AS-PCR 技术检测到的 SdhB<sup>P225F</sup> 突变方式占比为 43.5%,与我们利用传统方法筛选抗性菌株后并测序得到 P225F 点突变占比 45.4%无显著差异,也与本研究室 2023 年利用传统方法测得的该突变方式占比为 53.3%<sup>[14]</sup>的结果基本一致,充分说明在实际生产中利用本 AS-PCR 技术检测田间灰葡萄孢 SDHI 抗性是准确可靠的。此外,因重庆地区灰葡萄孢 SDHI 抗性菌株中 P225F 为主要突变方式,所以,该数据结果可在田间检测 SDHI 抗性菌株中起重要作用。

## 4 结论

本研究最终确定引物对 P225F-3F (5'-CTC TGCGCATGCTGCTCGACATCTTGCTTT-3') 和 P225F-R (5'-GCCATTCCTTCTTAATCTCCG CA-3')可以成功区分灰葡萄孢 SdhB<sup>P225F</sup> 点突变菌株,后经过反应条件和体系的优化,最终确定最适退火温度为 58  $^{\circ}\text{C}$ ,内参引物浓度为 2.5  $\mu\text{mol/L}$ ,经验证该体系灵敏度高达为 10  $\text{fg}/\mu\text{L}$ ,并成功检测田间样本,该检测方法简化了实验步骤,

缩短了试验周期,同时该技术灵敏度高,更加适于田间应用。因此,本研究建立的多重AS-PCR体系对于监测灰葡萄孢对SDHI杀菌剂产生的抗性频率具有一定的应用价值。

## 作者贡献声明

刘梦晴:数据提供,论文撰写;屠紫娟:数据提供,图片处理;余洋:论文撰写修改;杨宇衡:数据处理;方安菲:图片处理,论文修改;田斌年:论文撰写指导;王静:数据处理,论文撰写指导;毕朝位:试验设计,论文撰写指导。

## 作者利益冲突公开声明

作者声明绝无任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

## REFERENCES

- [1] ALIZADEH HR, SHARIFI-TEHRANI A, HEDJAROUDE GA. 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, van KAN JAL. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease[J]. Molecular Plant Pathology, 2007, 8(5): 561-580.
- [3] 曹依静, 孙共明. 设施草莓灰霉病发生规律与综合防治技术[J]. 山西果树, 2015(2): 49-50.  
CAO YJ, SUN GM. Occurrence regularity and integrated control techniques of strawberry gray mold in protected facilities[J]. Shanxi Fruits, 2015(2): 49-50 (in Chinese).
- [4] AVENOT H, SIMONEAU P, IACOMI-VASILESCU B, BATAILLÉ-SIMONEAU N. 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.
- [5] DUAN YB, GE CY, ZHOU MG. 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.
- [6] JIANG JH, DING LS, MICHAILIDES TJ, LI HY, MA ZH. Molecular characterization of field azoxystrobin-resistant isolates of *Botrytis cinerea*[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2009, 93(2): 72-76.
- [7] ULRICH JT, MATHRE DE. Mode of action of oxathiin systemic fungicides. V. Effect on electron transport system of *Ustilago maydis* and *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Bacteriology, 1972, 110(2): 628-632.
- [8] 宋昱菲. 山东省灰霉病菌对六种琥珀酸脱氢酶抑制剂类杀菌剂的敏感性检测及对啉酰菌胺抗性机制探究[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2019.  
SONG YF. Sensitivity detection of *Botrytis cinerea* to six kinds of succinate dehydrogenase inhibitor fungicides in Shandong Province and study on the mechanism of resistance to amide[D]. Tai'an: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [9] FERNÁNDEZ-ORTUÑO D, PÉREZ-GARCÍA A, CHAMORRO M, deLa PEÑA E, de VICENTE A, TORÉS JA. Resistance to the SDHI fungicides boscalid, fluopyram, fluxapyroxad, and penthiopyrad in *Botrytis cinerea* from commercial strawberry fields in Spain[J]. Plant Disease, 2017, 101(7): 1306-1313.
- [10] RODRÍGUEZ A, ACOSTA A, RODRÍGUEZ C. Fungicide resistance of *Botrytis cinerea* in tomato greenhouses in the Canary Islands and effectiveness of non-chemical treatments against gray mold[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2014, 30(9): 2397-2406.
- [11] PANEBIANCO A, CASTELLO I, CIRVILLERI G, PERRONE G, EPIFANI F, FERRARA M, POLIZZI G, WALTERS DR, VITALE A. Detection of *Botrytis cinerea* field isolates with multiple fungicide resistance from table grape in Sicily[J]. Crop Protection, 2015, 77: 65-73.
- [12] 刘欣, 吴雁, 成玮, 曾蓉, 徐丽慧, 高士刚, 戴富明. 上海地区草莓灰霉病菌对啉酰菌胺的敏感性检测及抗性机制分析[J]. 农药学报, 2018, 20(4): 452-458.  
LIU X, WU Y, CHENG W, ZENG R, XU LH, GAO SG, DAI FM. Sensitivity and resistance mechanism to boscalid of *Botrytis cinerea* from strawberry in Shanghai[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2018, 20(4): 452-458 (in Chinese).
- [13] 肖婷, 陈露, 张建华, 芮东明, 许媛, 吉沐祥, 杨敬辉. 江苏省句容市灰霉病菌对啉酰菌胺的抗药性[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(1): 50-55.  
XIAO T, CHEN L, ZHANG JH, RUI DM, XU Y, JI MX, YANG JH. Boscalid resistance in field populations of *Botrytis cinerea* in Jurong city of Jiangsu province[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2018, 34(1): 50-55 (in Chinese).
- [14] 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: 西南大学硕士学位论文, 2023.  
LI PF. Study on drug resistance monitoring and mechanism of *Botrytis cinerea* in strawberry of Chongqing[D]. Chongqing: Master's Thesis of Southwest University, 2023 (in Chinese).
- [15] HÄGERHALL C. Succinate: quinone oxidoreductases variations on a conserved theme[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1997, 1320(2): 107-141.
- [16] GAO YY, HE LF, ZHU JM, CHENG JG, LI BX, LIU F, MU WY. The relationship between features enabling SDHI fungicide binding to the Sc-Sdh complex and its inhibitory activity against *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. Pest Management Science, 2020, 76(8): 2799-2808.
- [17] 陶丽红, 李佳俊, 夏美荣, 李康, 范黎明, 苏发武, 吴文伟, 王凯博, 叶敏. 五种琥珀酸脱氢酶抑制剂类

- 杀菌剂与灰葡萄孢琥珀酸脱氢酶的结合模式及抗性机制分析[J]. 农药学学报, 2021, 23(6): 1085-1096.
- TAO LH, LI JJ, XIA MR, LI K, FAN LM, SU FW, WU WW, WANG KB, YE M. Analysis of the binding modes and resistance mechanism of five succinate dehydrogenase inhibitor fungicides with *Botrytis cinerea* succinate dehydrogenase[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2021, 23(6): 1085-1096 (in Chinese).
- [18] 毛玉帅, 段亚冰, 周明国. 琥珀酸脱氢酶抑制剂类杀菌剂抗性研究进展[J]. 农药学学报, 2022, 24(5): 937-948.
- MAO YS, DUAN YB, ZHOU MG. Research progress of the resistance to succinate dehydrogenase inhibitors[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2022, 24(5): 937-948 (in Chinese).
- [19] LEROUX P, GREDET M, LEROCH M, WALKER AS. Exploring mechanisms of resistance to respiratory inhibitors in field strains of *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mold[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(19): 6615-6630.
- [20] SHAO WY, ZHAO YF, MA ZH. Advances in understanding fungicide resistance in *Botrytis cinerea* in China[J]. Phytopathology, 2021, 111(3): 455-463.
- [21] SHAO WY, SUN JT, ZHANG XK, CHEN CJ. Amino acid polymorphism in succinate dehydrogenase subunit C involved in biological fitness of *Botrytis cinerea*[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2020, 33(4): 580-589.
- [22] 李美霞. 小麦赤霉病菌呼吸链系统关键基因对呼吸链抑制剂类杀菌剂药敏性的调控作用研究[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2019.
- LI MX. Regulation effect of key genes in respiratory chain system on sensitivity of *Fusarium asiaticum* to respiratory inhibitor fungicides[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [23] MA DC, ZHU JM, JIANG JG, ZHAO YH, LI BX, MU W, LIU F. Evaluation of bioactivity and control efficacy of tetramycin against *Corynespora cassiicola*[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2018, 152: 106-113.
- [24] RAMPERSAD SN. A rapid colorimetric microtiter bioassay to evaluate fungicide sensitivity among *Verticillium dahliae* isolates[J]. Plant Disease, 2011, 95(3): 248-255.
- [25] 王真. 几种植物病原菌对杀菌剂的抗药性研究[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2009.
- WANG Z. Study on resistance of some plant pathogens to fungicides[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2009 (in Chinese).
- [26] PERCIVAL GC, 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.
- [27] MA ZH, YOSHIMURA MA, MICHAILIDES TJ. 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.
- [28] 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.
- LUO M, YIN WX, LUO CX. An allele-specific PCR for detecting the carbendazim resistance in *Monilinia fructicola*[J]. Plant Protection, 2020, 46(6): 136-143, 154 (in Chinese).
- [29] 郭东锋, 钟林宇, 周挺, 张玥, 李林翰, 周倩, 陈凤平. 马铃薯晚疫病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.
- GUO DF, ZHONG LY, ZHOU T, ZHANG Y, LI LH, ZHOU Q, CHEN FP. Rapid detection of metalaxyl resistance in potato late blight pathogen *Phytophthora infestans*[J]. Journal of Plant Protection, 2023, 50(1): 214-223 (in Chinese).
- [30] HASHIMOTO M, AOKI Y, SAITO S, SUZUKI S. 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.
- [31] BUCHHAVE P, von BENZON HH. Exploring PDA configurations[J]. Particle & Particle Systems Characterization, 1996, 13(2): 68-78.
- [32] CONLON BH, SCHMIDT S, POULSEN M, SHIK JZ. Orthogonal protocols for DNA extraction from filamentous fungi[J]. STAR Protocols, 2022, 3(1): 101126.
- [33] 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: 西南大学硕士学位论文, 2023.
- SHEN LN. Expression of carbendazim resistance in *Fusarium graminearum* heterokaryon and resistance monitoring of *Fusarium* in Sichuan and Chongqing[D]. Chongqing: Master's Thesis of Southwest University, 2023 (in Chinese).
- [34] MILES TD, NEILL TM, COLLE M, WARNEKE B, ROBINSON G, STERGIPOULOS I, MAHAFFEE WF. Allele-specific detection methods for QoI fungicide-resistant *Erysiphe necator* in vineyards[J]. Plant Disease, 2021, 105(1): 175-182.