

抗氰烯菌酯假禾谷镰孢突变体的诱导及其生物学特性

逯燕腾^{1,2}, 李新蕾², 邓渊钰², 曹淑琳², 李伟²,
孙海燕^{2*}, 陈怀谷^{1,2*}

(1. 南京农业大学植物保护学院, 南京 210095; 2. 江苏省农业科学院植物保护研究所, 南京 210014)

摘要 为评估引起小麦茎基腐病的病原菌假禾谷镰孢 *Fusarium pseudograminearum* 对氰烯菌酯的抗性风险, 对 5 株敏感菌株进行了室内药剂驯化, 获得 33 株抗性突变体, 突变频率为 16.5%, 其对氰烯菌酯的抗性水平范围为 7.39~1 665.76 倍, 3 株表现低抗, 4 株表现中抗, 26 株表现高抗; 发现在 *myosin-5* 基因上存在 11 种抗性突变类型, 其中 217 位的丝氨酸突变为亮氨酸(S217L)、420 位的谷氨酸突变为赖氨酸(E420K)和 135 位的丙氨酸突变为苏氨酸(A135T)为主要突变类型, 其比例分别为 45.5%、15.2% 和 9.1%。S217L 型抗性突变体的产孢量显著下降, 菌丝生长速率和致病力与亲本菌株无显著差异。E420K 型抗性突变体的菌丝生长速率和致病力显著下降, 产孢量与亲本菌株无显著差异。A135T 型抗性突变体的菌丝生长速率和产孢量与亲本菌株无显著差异。研究结果表明假禾谷镰孢在药剂选择压力下易形成氰烯菌酯的抗性群体, 对氰烯菌酯存在中到高等的潜在抗性风险, 其 *myosin-5* 的点突变与其对氰烯菌酯的抗性相关。

关键词 小麦茎基腐病; 假禾谷镰孢; 氰烯菌酯; 抗药性; 生物学特性; *myosin-5*

中图分类号: S 435.121.49 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2021707

Induction and biological characteristics of phenamacril-resistant mutants of *Fusarium pseudograminearum*

LU Yanteng^{1,2}, LI Xinlei², DENG Yuanyu², CAO Shulin², LI Wei², SUN Haiyan^{2*}, CHEN Huaigu^{1,2*}

(1. College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agriculture Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract In order to assess the resistance risk of *Fusarium pseudograminearum* to phenamacril, a total of 33 phenamacril-resistant mutants were obtained through spontaneous selection with a mutation frequency of 16.5%, and the resistance level of these mutants to phenamacril ranged from 7.39 to 1 665.76 times, with three mutants showing low resistance, four mutants showing moderate resistance and 26 mutants showing high resistance. Eleven types of resistance mutations were found in *myosin-5* gene. A serine (S) to leucine (L) transition at position 217 (S217L), a glutamic (E) to lysine (K) transition at position 420 (E420K), and an alanine (A) to threonine (T) transition at position 135 (A135T) were major mutation types, with a frequency of 45.5%, 15.2% and 9.1%, respectively. Compared with the parental strains, the spore production of the type S217L resistant mutants was significantly decreased, but there was no significant difference in mycelial growth rate and pathogenicity. Mycelial growth rate and pathogenicity of the type E420K resistant mutants were significantly decreased, and no significant difference was observed in spore production. The point mutation of *myosin-5* was related to its resistance to phenamacril. The mycelial growth rate and spore production of A135T resistant mutants were not significantly different from the parental strains. The results suggested that *F. pseudograminearum* could easily form the phenamacril-resistant population under the pressure of fungicide selection, and had a moderate or high risk of resistance to phenamacril.

收稿日期: 2021-12-20

修订日期: 2022-03-10

基金项目: 江苏省农业科技自主创新资金项目(CX(21)2037); 国家现代农业产业技术体系(CARS-3); 江苏省重点研发计划(现代农业)(BE2019377)

* 通信作者 E-mail: 孙海燕 sunhaiyan8205@126.com; 陈怀谷 huaigu@hotmail.com

Key words wheat crown rot; *Fusarium pseudograminearum*; phenamacril; resistance; biological characteristics; myosin-5

小麦茎基腐病(crown rot, CR)是由多种镰刀菌引起的土传病害^[1-3],在美国、加拿大、澳大利亚、中国等地广泛发生^[4-8],我国小麦茎基腐病的主要病原菌为假禾谷镰孢 *Fusarium pseudograminearum*、亚洲镰孢 *F. asiaticum* 和禾谷镰孢 *F. graminearum* 等。不同地区引起茎基腐病的优势种不同,河南、河北、山西及山东等地以假禾谷镰孢为优势种,而安徽、江苏等地以禾谷镰孢复合种为主^[1,7-8]。

小麦茎基腐病从小麦分蘖到成熟期均可发生,感病小麦茎基部叶鞘和茎秆变褐,茎节坏死,严重时植株死亡、枯白(孕穗期),出现白穗,小麦产量下降^[8]。2010年前,该病害在我国偶有发生,危害不严重。近年来由于秸秆还田使土壤内病原菌不断积累、不合理使用化肥导致土壤盐渍化严重,该病害在我国黄淮海区逐年加重,对小麦安全生产构成严重威胁^[9-11]。据报道,2013年—2016年间小麦茎基腐病在河南省部分重病田造成小麦产量损失高达38.0%~61.3%^[12-13];在河北省严重地块白穗率高达20%~50%^[14];2019年山东省邹城市小麦茎基腐病地块发生率高达66.8%^[15];2017年—2019年,陕西省小麦茎基腐病发生面积均达到10万hm²以上^[16]。

化学防治是目前控制该病害发生的主要方法之一。纪莉景等研究发现6种种衣剂包衣处理对小麦苗期茎基腐病株率和病情指数的防效分别在60.4%~100.0%和45.5%~100.0%,随着小麦生育期的推移,种衣剂的防治效果均呈下降趋势^[17]。张守成等研究发现种子处理或返青期喷施不同杀菌剂对小麦茎基腐病均有较好防效,但不同杀菌剂的防控效果及持效期有明显差异^[18]。

氰烯菌酯是一种2-氰基丙烯酸酯类杀菌剂,由江苏省农药研究所于1998年自主研发。它对镰刀菌具有专化抗菌活性,已登记用于小麦赤霉病和水稻恶苗病的防治^[19-20]。据报道,氰烯菌酯能抑制禾谷镰孢肌球蛋白 myosin-5 马达结构域的ATP酶活性,从而导致肌动蛋白丝聚合受阻,影响囊泡运输,使菌丝细胞不能极性生长^[21-23]。肌球蛋白 myosin-5 基因的突变导致了禾谷镰刀菌对氰烯菌酯的抗性。目前该药剂还未在小麦茎基腐病防治上登记使

用,也未有假禾谷镰孢对其抗性的研究报道。本研究以假禾谷镰孢为研究对象,对其进行氰烯菌酯抗性突变体的诱导,并对抗性机理和突变体生物学特性进行研究,以期氰烯菌酯在小麦茎基腐病防治上的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试菌株:5株分别从山东寿光、江苏盐城和连云港采集的假禾谷镰孢菌株CF1558、CF1566、CF15128、CF15263和CF15281,由江苏省农业科学院植物保护研究所小麦病害防控团队分离纯化、保存和鉴定。

供试药剂:95%氰烯菌酯原药,由江苏省农药研究所股份有限公司提供,用甲醇溶解配制成 $1 \times 10^4 \mu\text{g/mL}$ 的母液,于4℃保存,备用。

马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基:马铃薯200g、葡萄糖20g、琼脂粉15g,加蒸馏水定容至1L,用于菌株的培养及保存;羧甲基纤维素钠(CMC)培养基:羧甲基纤维素钠15g、NH₄NO₃1g、KH₂PO₄1g、MgSO₄·7H₂O0.5g、酵母提取物1g,加蒸馏水定容至1L,用于菌株产孢培养。

1.2 方法

1.2.1 假禾谷镰孢抗性突变体诱导

将5株假禾谷镰孢分别接种到PDA平板上预培养4d后,于菌落边缘打取直径5mm的菌饼,将菌饼菌丝面朝下接于含5μg/mL氰烯菌酯的PDA平板上^[24],每平板接种10个菌饼,每菌株接种40个,25℃黑暗培养。培养过程中出现的扇形突变菌落即为疑似抗性突变体,将其转接到含5μg/mL氰烯菌酯的PDA平板上进行抗性验证,能够生长的即为抗性突变体,命名为R-亲本菌株编号后两位-序号。计算抗性突变频率。

抗性突变频率=(抗性突变体数/药剂驯化的菌饼数)×100%。

1.2.2 抗性水平测定

将抗性突变体及其亲本菌株分别接种到PDA平板上,25℃预培养4d后,在菌落边缘打取直径为5mm的菌饼,亲本菌株转接到含0、0.125、0.25、0.5、1、2、4μg/mL氰烯菌酯的PDA平板上,抗性突

变体接于含 0、0.625、1.25、2.5、5、10、20、40、80、160 $\mu\text{g/mL}$ 氰烯菌酯的 PDA 平板上,25℃ 黑暗培养 4 d,十字交叉法测量菌落直径取平均值。每菌株 3 次重复。根据各突变体的 EC_{50} 与其亲本菌株的 EC_{50} 比值计算抗性倍数,根据抗性倍数将各突变体的抗性水平划分为敏感、低抗、中抗和高抗^[25],其中:抗性倍数 ≤ 3 的为敏感菌株(S); $3 <$ 抗性倍数 ≤ 10 的为低抗菌株(LR); $10 <$ 抗性倍数 ≤ 100 的为中抗菌株(MR);抗性倍数 > 100 的为高抗菌株(HR)。

1.2.3 抗性遗传稳定性测定

从药剂驯化获得的抗性突变体中每种突变类型各选取 1 株进行测定。将-80℃ 保存 6 个月后的 11 株抗性突变体在无药 PDA 平板上继代培养 4 代,25℃ 黑暗培养 5 d,按 1.2.2 节方法中的十字交叉法测定抗性突变体对氰烯菌酯的敏感性(EC_{50}),计算抗性倍数,并根据抗性突变体的生长速度确定其遗传稳定性。

1.2.4 *myosin-5* 基因扩增及序列分析

将抗性突变体及其亲本菌株在 PDA 平板上 25℃ 恒温培养 4 d 后,收集菌丝,采用 CTAB 法提取菌丝基因组 DNA^[26]。使用 *myosin-5* 基因序列特异性引物 5-F (5'-CGACAAATTCACCTTCAG-GCTC-3'), 5-R (5'-TTGCCTGTCTGCTACCAT-CA-3'),以提取的基因组 DNA 为模板,使用南京诺唯赞生物科技有限公司的 Max Super-Fidelity DNA Polymerase 进行 PCR 扩增,扩增程序为:95℃ 预变性 3 min;95℃ 变性 15 s,58℃ 退火 15 s,72℃ 延伸 60 s,循环 35 次;72℃ 延伸 5 min,4℃ 保存。扩增产物采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,将目的扩增产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序,分析突变体 *myosin-5* 基因的碱基及氨基酸变化情况。

1.2.5 抗性突变体的生物学特性研究

1.2.5.1 菌丝生长速率测定

将抗性突变体及其亲本菌株分别沿菌落边缘,用直径为 5 mm 的打孔器打取菌饼,接种于无药 PDA 平板上,25℃ 黑暗培养 4 d 后,十字交叉法测量菌落直径^[27]。每菌株 3 次重复。

1.2.5.2 产孢量测定

将抗性突变体及其亲本菌株沿菌落边缘打取直

径为 5 mm 的菌饼,放入装有 50 mL CMC 的培养瓶中,每瓶接种 5 个菌饼,25℃、150 r/min 振荡培养,诱导产孢。5 d 后无菌条件下过滤获得孢子悬浮液,适量无菌水稀释至合适浓度,用血球计数板在显微镜下计算孢子数量。每菌株 3 次重复。

1.2.5.3 致病力测定

抗性突变体及其亲本菌株对苗期小麦的致病力测定参照 Gardiner 等^[28]的方法。采用 1.2.5.2 方法诱导产孢,将孢子悬浮液浓度调整至 1×10^5 个/mL。将消毒后的‘扬麦 158’小麦种子置于铺有单层滤纸的培养皿中,清水保湿,在 25℃ 恒温培养箱中进行催芽。2 d 后选取萌发一致的种子浸蘸孢子悬浮液 10 s,用无纺布包裹保持均匀间距的 10 粒种子竖直放置于装有适量水的广口塑料瓶中,25℃、L//D=12 h//12 h 光暗交替的培养箱培养,培养过程中清水保湿。每处理 3 次重复,14 d 后记录幼苗发病情况。参照 Bovill 等^[29]的方法根据第 1 叶鞘下茎秆褐变长度,对小麦茎基腐病发生的严重度进行分级,0 级:无病;1 级:褐变长度为 25% 以下;2 级:褐变长度为 25%~50%;3 级:褐变长度为 51%~75%;4 级:褐变长度为 76%~100%。计算各处理的病情指数。

病情指数 = $100 \times \Sigma(\text{各级病株数} \times \text{病级值}) / (\text{调查总株数} \times 4)$ 。

1.3 数据分析

采用 DPS 数据处理系统 LSD 法对试验数据进行统计分析,测序结果用 DNAMAN 软件进行序列对比分析。

2 结果与分析

2.1 假禾谷镰孢抗性突变体的类型

5 株亲本菌株经药剂驯化 25 d 后,共获得 33 株抗性突变体,平均突变频率为 16.5%。通过对抗性突变体及其亲本菌株的 *myosin-5* 基因序列分析,发现 11 种突变类型,其中 217 位丝氨酸(serine)突变为亮氨酸(leucine)(S217L)、420 位谷氨酸(glutamic acid)突变为赖氨酸(lysine)(E420K)和 135 位丙氨酸(alanine)突变为苏氨酸(threonine)(A135T)为主要突变类型,其比例分别为 45.5%、15.2% 和 9.1%(表 1)。

2.2 假禾谷镰孢抗性突变体的抗性水平

5 株亲本菌株对氰烯菌酯的 EC_{50} 为 0.27~

0.38 $\mu\text{g/mL}$, 33 株抗性突变体的 EC_{50} 为 2.07~459.75 $\mu\text{g/mL}$, 抗性水平范围为 7.39~1 665.76 倍。33 株抗性突变体中 3 株表现低抗, 4 株表现中抗, 26 株表现高抗。3 种主要突变类型中, S217L 型和 E420K 型表现高抗, A135T 型表现低抗(表 1)。

表 1 假禾谷镰孢抗氰烯菌酯突变体的突变类型和抗性水平¹⁾

Table 1 Mutation types and resistance level of phenamacril-resistant mutants of <i>Fusarium pseudograminearum</i>						
抗性水平 Resistance level	突变位点 Mutant position	突变类型 Mutation type	突变数量 Number of mutants	抗性频率/% Resistance frequency	有效抑制中 浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ EC_{50}	抗性倍数/倍 Resistance factor
LR	135	A→T	3	9.1	2.07~2.80	7.39~9.29
MR	418	S→G	1	3.0	13.83	49.39
	577	A→E	1	3.0	13.28	47.43
		A→T	1	3.0	2.97	10.61
	581	I→T	1	3.0	4.96	13.05
HR	215	E→K	2	6.1	42.28~45.22	123.22~154.31
	577	A→G	1	3.0	59.28	210.96
	216	K→E	2	6.1	188.27~242.53	682.14~885.15
		K→N	1	3.0	129.03	459.18
	217	S→L	15	45.5	232.14~293.86	847.22~1 072.48
	420	E→K	5	15.2	182.37~459.75	660.76~1 665.76

1) A: 丙氨酸; E: 谷氨酸; G: 甘氨酸; I: 异亮氨酸; K: 赖氨酸; L: 亮氨酸; N: 天冬酰胺; S: 丝氨酸; T: 苏氨酸。
A: Alanine; E: Glutamic acid; G: Glycine; I: Isoleucine; K: Lysine; L: Leucine; N: Asparagine; S: Serine; T: Threonine.

2.3 假禾谷镰孢抗性突变体的遗传稳定性

经药剂驯化的 11 株抗性突变体在无药的 PDA 培养基上继代培养 4 代后, 第 1 代和第 4 代的菌落生长速度无明显差异, 对氰烯菌酯的 EC_{50} 也无明显变化(表 2), 表明室内药剂驯化获得的假禾谷镰孢抗氰烯菌酯突变体可稳定遗传。

表 2 假禾谷镰孢抗氰烯菌酯突变体的抗性遗传稳定性

Table 2 Resistance hereditary stability of phenamacril resistant mutants of <i>Fusarium pseudograminearum</i>				
菌株 Strain	菌落直径/cm Colony diameter		抗性倍数 Resistance factor	
	第 1 代 The 1st generation	第 4 代 The 4th generation	第 1 代 The 1st generation	第 4 代 The 4th generation
R263-5	6.10	6.30	7.39	7.47
R58-7	2.30	2.40	123.22	134.63
R128-4	6.50	6.00	885.15	833.39
R66-5	6.50	6.40	459.18	474.56
R128-1	7.50	7.70	1 072.48	980.90
R66-3	6.10	6.20	49.39	54.37
R281-3	3.70	3.90	214.78	291.99
R66-4	6.30	6.20	10.61	17.86
R281-15	7.20	7.10	47.43	42.57
R66-6	6.20	6.00	210.96	250.75
R263-4	6.60	6.40	13.05	14.43

2.4 假禾谷镰孢抗性突变体的生物学特性

2.4.1 菌丝生长速率

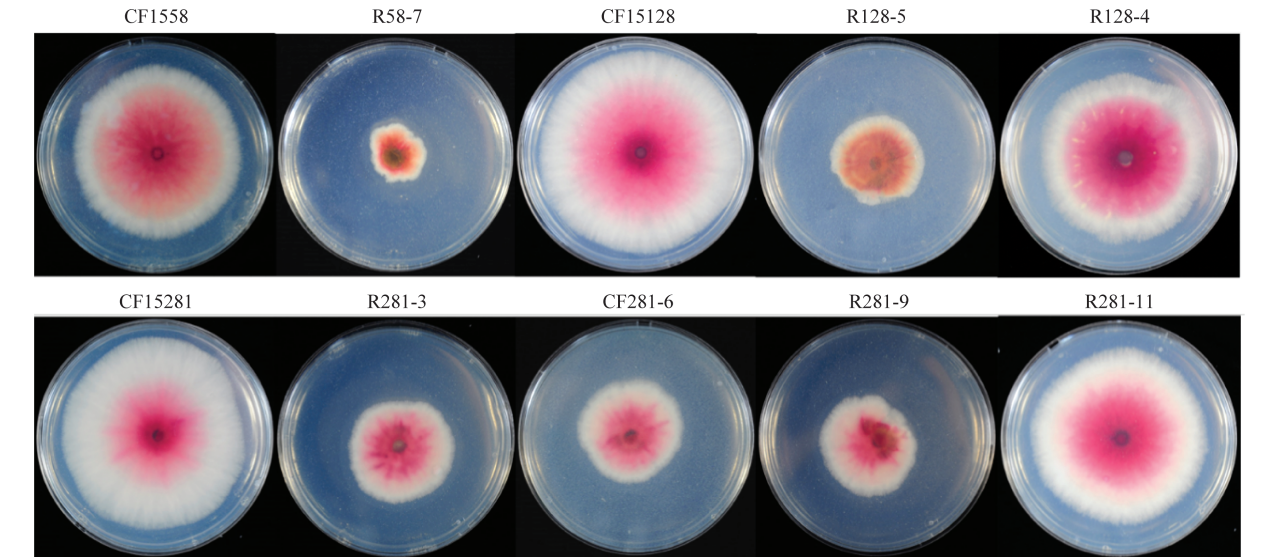
抗性突变体及其亲本菌株培养 4 d 后, 亲本菌株菌落直径在 6.07~7.40 cm 之间, 抗性突变体菌落直径在 2.30~7.57 cm 之间(表 3)。差异显著性分析结果表明, E420K、E215K 和 K216E 型抗性突变体的菌丝生长速率显著低于其亲本菌株(表 3, 图 1), 其他抗性突变体与其亲本菌株没有显著性差异 ($P>0.05$)。

2.4.2 产孢能力

S217L、E215K 和 I581T 型抗性突变体的产孢量显著低于其亲本菌株(表 3), 其他类型突变体的产孢量与其亲本菌株相似, 不存在显著差异 ($P>0.05$)。

2.4.3 致病力

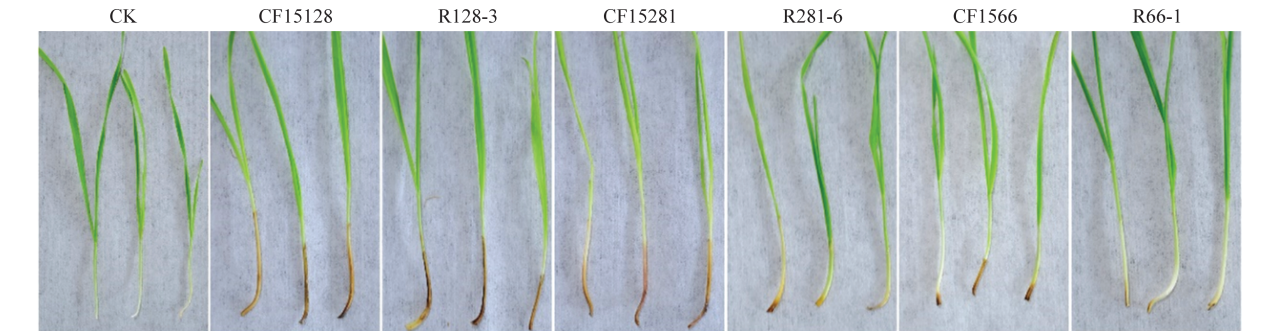
与亲本菌株相比, S217L、S418G 和 A577T 型抗性突变体的致病力无显著差异, 其他突变体的致病力显著下降 ($P<0.05$) (图 2), 病情指数下降范围在 5.37~48.44(表 3)。



CF1558, CF15128, CF15281: 亲本菌株; R58-7, R128-5: E215K型抗性突变体; R128-4, R281-11: K216E型抗性突变体; R281-3, R281-6, R281-9: E420K型抗性突变体
CF1558, CF15128, CF15281: Parental strains; R58-7, R128-5: E215K mutants; R128-4, R281-11: K216E mutants; R281-3, R281-6, R281-9: E420K mutants

图 1 假禾谷镰孢 E420K、E215K 和 K216E 型抗氰烯菌酯突变体及其亲本菌株的菌丝生长情况

Fig. 1 Mycelial growth of phenamacril-resistant mutants of E420K, E215K and K216E types of *Fusarium pseudograminearum* and their parental strains



R128-3: S217L型抗性突变体; R281-6: E420K型抗性突变体; R66-1: A135T型抗性突变体
R128-3: Mutant with S217L type; R281-6: Mutant with E420K type; R66-1: Mutant with A135T type

图 2 3 种主要类型假禾谷镰孢抗氰烯菌酯突变体及其亲本菌株对苗期小麦的致病力

Fig. 2 Pathogenicity of three major phenamacril-resistant mutants of *Fusarium pseudograminearum* and their parental strains to wheat seedlings

表 3 假禾谷镰孢抗氰烯菌酯突变体及其亲本菌株的生物学特性¹⁾
Table 3 Biological characteristics of the phenamacril-resistant mutants of *Fusarium pseudograminearum* and their parental strains

菌株 Strain	突变类型 Mutation type	菌落直径/cm Colony diameter	产孢量/×10 ⁶ 个·mL ⁻¹ Conidial production	病情指数 Disease index
CF1566	—	(6.10±0.06)hij	(17.72±6.67)bc	(40.00±6.61)defg
R66-1	A135T	(5.93±0.54)j	(23.00±11.92)a	(24.44±5.30)ghi
CF15263	—	(6.57±0.07)defg	(21.50±2.08)ab	(64.17±5.83)abc
R263-5	A135T	(6.13±0.03)ghij	(7.83±1.27)cde	(44.17±5.83)cdefg
CF15281	—	(6.80±0.12)cde	(0.43±0.05)e	(77.42±2.89)a
R281-13	A135T	(6.97±0.03)bcd	(0.61±0.29)e	(46.67±7.26)cdef
CF1558	—	(6.07±0.07)ij	(18.22±6.05)abc	(34.17±4.41)defgh
R58-7	E215K	(2.30±0.06)l	(1.11±0.28)e	(12.50±1.44)i
CF15128	—	(7.40±0.00)ab	(12.66±6.62)bcd	(77.31±8.86)a
R128-5	E215K	(3.50±0.20)k	(1.89±0.87)e	(45.46±4.92)cdefg

续表 3 Table 3(Continued)

菌株 Strain	突变类型 Mutation type	菌落直径/cm Colony diameter	产孢量/×10 ⁶ 个·mL ⁻¹ Conidial production	病情指数 Disease index
CF15128	—	(7.40±0.00)ab	(12.66±6.62)bcd	(77.31±8.86)a
R128-4	K216E	(6.47±0.41)efghi	(5.67±0.92)de	(38.43±5.37)defg
CF15281	—	(6.80±0.12)cde	(0.43±0.05)e	(77.42±2.89)a
R281-11	K216E	(6.17±0.09)fghij	(1.89±0.87)e	(28.98±14.52)fghi
CF1566	—	(6.10±0.06)hij	(17.72±6.67)bc	(40.00±6.61)efgh
R66-5	K216N	(6.53±0.09)defgh	(17.56±3.28)abc	(28.43±2.19)fghi
CF15128	—	(7.40±0.00)ab	(12.66±6.62)bcd	(77.31±8.86)a
R128-1	S217L	(7.50±0.00)a	(0.83±0.19)e	(65.08±2.56)abc
R128-2	S217L	(7.17±0.15)abc	(1.94±0.48)e	(73.33±3.63)ab
R128-3	S217L	(7.57±0.13)a	(2.57±1.01)e	(74.63±8.25)ab
CF1566	—	(6.10±0.06)hij	(17.72±6.67)bc	(40.00±6.61)defg
R66-3	S418G	(6.13±0.07)ghij	(20.94±2.56)ab	(33.33±3.63)efghi
CF15281	—	(6.80±0.12)cde	(0.43±0.05)e	(77.42±2.89)a
R281-3	E420K	(3.67±0.15)k	(1.72±0.72)e	(55.00±1.44)bcd
R281-6	E420K	(3.87±0.03)k	(3.11±2.28)de	(50.90±18.32)cde
R281-9	E420K	(3.67±0.15)k	(1.22±0.72)e	(40.83±15.83)defg
CF1566	—	(6.10±0.06)hij	(17.72±6.67)bc	(40.00±6.61)defg
R66-4	A577T	(6.27±0.07)fghij	(18.39±0.63)ab	(34.63±2.13)defgh
CF15281	—	(6.80±0.12)cde	(0.43±0.05)e	(77.42±2.89)a
R281-15	A577E	(7.20±0.00)abc	(1.72±0.29)e	(40.38±1.13)defg
CF1566	—	(6.10±0.06)hij	(17.72±6.67)bc	(40.00±6.61)defg
R66-6	A577G	(6.17±0.03)fghij	(17.06±2.53)abc	(15.00±5.77)hi
CF15263	—	(6.57±0.07)defg	(21.50±2.08)ab	(64.17±5.83)abc
R263-4	I581T	(6.60±0.06)def	(5.67±0.92)de	(40.39±5.61)defg

1) 同列数据后不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著; 菌株编号以“CF”开头为亲本菌株,以“R”开头为抗性突变体。
Different lowercase letters in the same column indicate significant differences at 0.05 level. The strain number starting with “CF” is the parental strain, and starting with “R” the resistant mutant.

3 结论与讨论

小麦茎基腐病是近年来我国小麦生产中发展迅速、危害严重的病害之一。该病害在小麦整个生育期都可发生,目前还未有完善的防治体系。周淼平等研究发现黄淮麦区大部分小麦推广品种对小麦茎基腐病表现感病或高度感病,无高抗品种,只有极少数表现中抗^[30]。因此在缺乏好的抗病品种情况下,化学防治是确保小麦稳产的重要保障。目前小麦茎基腐病化学防治研究主要集中于筛选有效药剂和明确药剂防效^[15-18],对药剂的抗性风险评估和抗性机制研究还很少。前期研究结果表明,氰烯菌酯对假禾谷镰孢等小麦茎基腐病菌具有较好的抑制作用,对于田间病害的发生也具有较好的控制效果。明确小麦茎基腐病菌对氰烯菌酯的抗性风险和抗性机制对于该药剂在防治小麦茎基腐病中的开发应用有重要意义。

已有研究表明,氰烯菌酯的作用靶标是病原菌的肌球蛋白-5(myosin-5)^[23,31]。肌球蛋白是真核细

胞中肌动蛋白依赖的 ATP 酶的马达蛋白,在细胞质运动、细胞极性、转录因子调控、胞内运输和信号转导上有着极其重要的作用^[23,31]。病原菌对氰烯菌酯产生抗性与肌球蛋白-5 点突变相关。周明国教授团队研究发现小麦赤霉病菌的肌球蛋白-5 至少有 12 个氨基酸残基可发生总频率为 23.9%的不同抗药性水平变异^[32],其中最常见的突变类型是 217 位的丝氨酸突变为亮氨酸(S217L)和 420 位的谷氨酸突变为赖氨酸(E420K)^[33]。李斌研究发现水稻恶苗病菌对氰烯菌酯产生田间抗性的主要原因是肌球蛋白-5 的 219 位由丝氨酸突变为脯氨酸(S219P)和丝氨酸突变为亮氨酸(S219L)^[34]。本研究发现假禾谷镰孢对氰烯菌酯的抗性至少存在 11 种突变类型,主要突变类型与小麦赤霉病菌相似,都为 S217L 和 E420K 型,这表明不同镰刀菌对氰烯菌酯的抗性机制相似。

氰烯菌酯作用位点单一,其抗性风险备受关注。本文研究发现在离体条件下假禾谷镰孢对氰烯菌酯易产生抗性,平均突变频率为 16.5%,这与

亚洲镰孢对氰烯菌酯的突变频率相近,这可能与氰烯菌酯的作用靶标相关,且其作用靶标肌球蛋白-5 的马达结构域在药剂作用下容易发生改变,从而导致抗性的产生。在获得的抗性突变体中主要突变类型(S217L 和 E420K)的抗性水平高,且 S217L 型抗性突变体的菌丝生长速率、致病力与其亲本相似,表明假禾谷镰孢对氰烯菌酯存在潜在的抗性风险。S217L 型抗性突变体的产孢能力显著低于其亲本菌株,E420K 型抗性突变体的菌丝生长速率、致病力显著低于其亲本菌株,表明这两种主要抗性突变体的适合度弱于亲本菌株,将来在田间流行的风险较低。周明国教授团队发现小麦赤霉病菌对氰烯菌酯的主要抗性突变类型(S217L)也是产孢能力低于亲本菌株^[33],推测与肌球蛋白-5 结构域内类似“口袋”的结构有关,在诱导过程中这类区域的变化可以直接影响抗药水平,也有可能间接影响病菌的其他表型。大部分在室内诱导下表现出高抗的抗性菌株的产孢量发生了显著的降低,减弱了突变菌株在田间的适应性,从而降低了抗性菌株在田间的种群比例^[35],这可能是氰烯菌酯在小麦赤霉病防治上使用近十年还一直未有抗药性报道的原因之一。

氰烯菌酯于 2012 年同时登记用于小麦赤霉病和水稻恶苗病的防治,但目前仅有水稻恶苗病菌对其有田间抗性的报道^[31]。这两种病原菌对氰烯菌酯田间抗性风险的差异可能与病原菌本身特性相关,也有可能与施药方式、施药剂量相关,氰烯菌酯在小麦赤霉病防治上主要是扬花期喷雾,在水稻恶苗病防治上主要是浸种。小麦茎基腐病的化学防治既可以用药剂种子包衣,也可以在小麦拔节前喷施药剂,不同用药方式是否会导致病原菌对药剂的抗性风险存在差异需要进行进一步的研究。

本研究尚处于室内试验阶段,所得结果仅可为假禾谷镰孢对氰烯菌酯的抗性风险评估提供参考,后续还将深入开展研究。

参考文献

- [1] DENG Yuanyu, LI Wei, ZHANG Peng, et al. *Fusarium pseudograminearum* as an emerging pathogen of crown rot of wheat in eastern China [J]. *Plant Pathology*, 2020, 69(2): 240–248.
- [2] DYER A T, JOHNSTON R H, HOGG A C, et al. Comparison of pathogenicity of the *Fusarium* crown rot (FCR) complex (*F. culmorum*, *F. pseudograminearum* and *F. graminearum*) on hard red spring and durum wheat [J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2009, 125(3): 387–395.
- [3] CHAKRABORTY S, OBANOR F, WESTECOT T R, et al. Wheat crown rot pathogens *Fusarium graminearum* and *F. pseudograminearum* lack specialization [J]. *Phytopathology*, 2010, 100(10): 1057–1065.
- [4] MITTER V, FRANCL L J, ALI S, et al. Ascosporic and conidial inoculum of *Gibberella zeae* play different roles in *Fusarium* head blight and crown rot of wheat in Australia and the USA [J]. *Australasian Plant Pathology*, 2006, 35(4): 441–452.
- [5] BENTLEY A R, CROMEY M G, FARROKHI-NEJAD R, et al. *Fusarium* crown and root rot pathogens associated with wheat and grass stem bases on the South Island of New Zealand [J]. *Australasian Plant Pathology*, 2006, 35(5): 495–502.
- [6] SUKUMAR C, FRIDAY O, RHYANNYN W, et al. Wheat crown rot pathogens *Fusarium graminearum* and *F. pseudograminearum* lack specialization [J]. *Phytopathology*, 2010, 100(10): 1057–1065.
- [7] 张向向,孙海燕,李伟,等. 我国冬小麦主产省小麦茎基腐镰孢菌的组成及其致病力[J]. *麦类作物学报*, 2014, 34(2): 272–278.
- [8] LI Honglian, YUAN Hongxia, FU Bo, et al. First report of *Fusarium pseudograminearum* causing crown rot of wheat in Henan, China [J]. *Plant Disease*, 2012, 96(7): 1065.
- [9] 王莉莉,朱凯,孙莹,等. 醚菌酯对假禾谷镰孢的抑制作用及对小麦茎基腐病的防效研究[J]. *植物病理学报*: 2022, 52(3): 434–442.
- [10] 胡蓉,郑露,刘浩,等. 秸秆还田对水稻根际微生物多样性和水稻纹枯病发生的影响[J]. *植物保护学报*, 2020, 47(6): 1261–1269.
- [11] 杨云,贺小伦,胡艳峰,等. 黄淮麦区主推小麦品种对假禾谷镰孢刀菌所致茎基腐病的抗性[J]. *麦类作物学报*, 2015, 35(3): 339–345.
- [12] 贺小伦,周海峰,袁虹霞,等. 河南和河北冬小麦区假禾谷镰孢的遗传多样性[J]. *中国农业科学*, 2016, 49(2): 272–281.
- [13] 徐飞,宋玉立,周益林,等. 2013–2016 年河南省小麦茎基腐病的发生危害情况及特点[J]. *植物保护*, 2016, 42(6): 126–132.
- [14] 纪莉景,栗秋生,王连生,等. 河北省小麦冠腐病发生现状及病原菌初探[J]. *植物保护*, 2016, 42(5): 154–157.
- [15] 赵艳丽,王祥会,胡英华,等. 种子包衣技术防治小麦茎基腐病的田间药效试验[J]. *中国农技推广*, 2020, 36(5): 63–65.
- [16] 魏会新,郭海鹏,贺亚红,等. 陕西省小麦茎基腐病防控技术研究[J]. *陕西农业科学*, 2021, 67(1): 1–3.
- [17] 纪莉景,王亚娇,栗秋生,等. 防治小麦茎基腐病种衣剂的筛选及全生育期防控效果[J]. *河北农业科学*, 2020, 24(2): 42–47.
- [18] 张守成,吴国峰,徐加健,等. 不同杀菌剂处理对小麦茎基腐病的防控效果[J]. *中国农技推广*, 2020, 36(2): 60–63.
- [19] 王龙根,倪珏萍,王凤云,等. 新杀菌剂 JS399-19 的生物活性研

- 究[J]. 农药, 2004(8): 380 - 383.
- [20] 祝燕丽, 黄劲松, 董涛海. 25% 氰烯菌酯(劲护)悬浮剂浸种对稻种安全性及防病效果研究[J]. 现代农业科技, 2012(24): 141.
- [21] BENINGO K A, LILLIE S H, BROWN S S. The yeast kinase-related protein Smy1p exerts its effects on the class V myosin Myo2p via a physical interaction [J]. Molecular Biology of the Cell, 2000, 11(2): 691 - 702.
- [22] TRYBUS K M. Myosin V from head to tail [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2008, 65(9): 1378 - 1389.
- [23] ZHENG Zhitian, HOU Yiping, CAI Yiqiang, et al. Whole-genome sequencing reveals that mutations in myosin-5 confer resistance to the fungicide phenamacril in *Fusarium graminearum* [J/OL]. Scientific Reports, 2015, 5: 8248. DOI: 10.1038/srep08248.
- [24] 高启迅. 小麦赤霉病菌对常用杀菌剂的抗性研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2016.
- [25] 原征. 小麦茎基腐病菌对咯菌腈的抗性风险评估及抗性机理研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2020.
- [26] 吴志红, 汪天虹, 黄卫, 等. 简便易行的丝状真菌染色体 DNA 提取法[J]. 菌物系统, 2001(4): 575 - 577.
- [27] BECHER R, HETTWER U, KARLOVSKY P, et al. Adaptation of *Fusarium graminearum* to tebuconazole yielded descendants diverging for levels of fitness, fungicide resistance, virulence, and mycotoxin production [J]. Phytopathology, 2010, 100(5): 444 - 453.
- [28] GARDINER D M, McDONALD M C, COVARELLI L, et al. Comparative pathogenomics reveals horizontally acquired novel virulence genes in fungi infecting cereal hosts [J/OL]. PLoS Pathogens, 2012, 8(9): e1002952. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002952.
- [29] BOVILL W D, HORNE M, HERDE D, et al. Pyramiding QTL increases seedling resistance to crown rot (*Fusarium pseudograminearum*) of wheat (*Triticum aestivum*) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2010, 121(1): 127 - 136.
- [30] 周森平, 姚金保, 张鹏, 等. 小麦抗茎腐病种质筛选及鉴定新方法的建立[J]. 植物遗传资源学报, 2016, 17(2): 377 - 382.
- [31] ZHANG Chengqi, CHEN Yun, YIN Yanni, et al. A small molecule species specifically inhibits *Fusarium* myosin I [J]. Environmental Microbiology, 2015, 17(8): 2735 - 2746.
- [32] 周明国. 杀菌剂氰烯菌酯新靶标的发现及其产业化应用[EB/OL]. (2018 - 03 - 20) [2021 - 12 - 20]. <https://kxyjy.njau.edu.cn/info/1063/6456.htm>.
- [33] LI B, ZHENG Z, LIU X, et al. Genotypes and characteristics of phenamacril-resistant mutants in *Fusarium asiaticum* [J]. Plant Disease, 2016, 100(8): 1754 - 1761.
- [34] 李斌. 亚洲镰孢菌(*Fusarium asiaticum*)对氰烯菌酯的抗药性遗传多样性及其适合度研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2017.
- [35] HOU Yiping, QU Xiangpu, MAO Xuewei, et al. Resistance mechanism of *Fusarium fujikuroi* to phenamacril in the field [J]. Pest Management Science, 2018, 74(3): 607 - 616.
- (责任编辑: 田 喆)
-
- (上接 234 页)
- [20] 赵杏利, 邓晖, 牛永春. 一种狗尾草病原真菌的鉴定及菌株致病性研究[J]. 菌物学报, 2010, 29(2): 172 - 177.
- [21] SHI T, LI C P, LI J F, et al. First report of leaf spot caused by *Bipolaris setariae* on cassava in China [J]. Plant Disease, 2010, 94(7): 919.
- [22] 牛晓庆, 余凤玉, 朱辉, 等. 椰子平脐蠕孢叶斑病原鉴定及生物学特性测定[J]. 热带作物学报, 2015, 36(3): 581 - 586.
- [23] XIAO S Q, ZHANG D, ZHAO J M, et al. First report of leaf spot of maize (*Zea mays*) caused by *Bipolaris setariae* in China [J]. Plant Disease, 2020, 104(2): 582.
- [24] RAMESH G V, PALANNA K B, VINAYKUMAR H D, et al. Occurrence and characterization of *Bipolaris setariae* associated with leaf blight of browntop millet (*Brachiaria ramosa*) in India [J]. Journal of Phytopathology, 2021, 169(10): 613 - 622.
- [25] RAMESH G V, PAI ANNA K B, PRAVEEN B, et al. First confirmed report of leaf blight on browntop millet caused by *Bipolaris setariae* in Southern Peninsular India [J]. Plant Disease, 2021, 105(5): 1561.
- [26] CUI Wenli, BIAN Jinyue, LI Dewei, et al. First report of leaf blight on Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*) caused by *Bipolaris setariae* in China [J]. Plant Disease, 2020, 104(9): 2523.
- [27] 谢淑娜. 利用多基因聚合分析进行平脐蠕孢属及其近似属的分子系统学研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2012.
- [28] LIANG Xiaoyu, PENG Yun, LIU Yanchao, et al. First report of *Bipolaris bicolor* causing a leaf spot disease on rubber tree [J]. Journal of Phytopathology, 2019, 167: 553 - 567.
- [29] 戴利铭, 熊延林, 李发昌, 等. 10 种杀菌剂对橡胶树喙突凸脐蠕孢菌的室内毒力测定[J]. 热带农业科技, 2020, 43(3): 13 - 15.
- [30] 时涛, 李超萍, 蔡吉苗, 等. 木薯新叶斑病原鉴定及其生物学特性[J]. 热带作物学报, 2010, 31(3): 457 - 463.
- [31] 杨叶, 王兰英, 胡美姣. 牛筋草离孢孢生物学特性及代谢产物活性测定[J]. 微生物学通报, 2009, 36(5): 666 - 671.
- [32] 何苏琴, 荆卓琼, 丁文娇, 等. 西藏秋播燕麦苗期褐斑病原鉴定及生物学特性研究[J]. 草原与草坪, 2011, 31(5): 30 - 33.
- [33] 郭宁, 胡清玉, 刘粤阳, 等. 玉米叶斑病菌麦根腐平脐蠕孢的生物学特性及其对杀菌剂的敏感性[J]. 华北农学报, 2019, 34(S1): 289 - 295.
- (责任编辑: 田 喆)