

分类号 S435
密级 公开 UDC 632



全日制硕士专业学位研究生学位论文

草莓主要抗药性病害的环介导等温扩增（LAMP）检测

作者姓名:	胡小然
指导教师:	张传清教授
专业学位名称:	农业推广硕士
领域名称:	植物保护
研究方向:	农业植物病理
所在学院:	农业与食品科学学院
论文提交日期:	2018年3月5日

浙江农林大学
2018年3月5日

Zhejiang A&F University

Master Degree Thesis



**Development Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)
for Detection of Resistant Diseases in Strawberry**

Candidate: HU Xiao-ran

Supervisor: ZHANG Chuan-qing, Professor

Specialty: Plant Protection

Date of Submission: March 5, 2018

Zhejiang A&F University

Lin'an, Zhejiang province, P.R.China

March, 2018

独 创 性 声 明

本人声明，所呈交的学位论文，是受公益性行业(农业)科研专项“农作物重要病原菌抗药性监测及治理技术研究与示范”（项目编号：201303023）和浙江省重点研发项目“草莓安全生产关键技术集成研究与推广应用”（2015C02G1320008）资助，在指导教师指导下，通过我的努力取得的成果，并且是自己撰写的。尽我所知，除了文中作了标注和致谢中已经作了答谢的地方外，论文中不包含其他人发表或撰写过的研究成果，也不包含在浙江农林大学或其他教育机构获得学位或证书而使用过的材料。与我一同对本研究做出贡献的同志，都在论文中作了明确的说明并表示了谢意。如被查有严重侵犯他人知识产权的行为，由本人承担应有的责任。

学位论文作者亲笔签名：_____ 日 期：_____

论文使用授权的说明

本人完全了解浙江农林大学有关保留、使用学位论文的规定，即学校有权送交论文的复印件，允许论文被查阅和借阅；学校可以公布论文的全部或部分内容，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文。

保密，在____年后解密可适用本授权书。 ☐

不保密，本学位论文属于不保密。 ☐

（请在方框内打“√”）

学位论文作者亲笔签名：_____ 日 期：_____

指导教师亲笔签名：_____ 日 期：_____

摘要

[目的] 主要由胶孢炭疽菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 引起的炭疽病和由灰葡萄孢菌 (*Botrytis cinerea*) 引起的灰霉病是草莓生产上两大主要病害。化学防治是草莓生产上防治炭疽病、灰霉病两大病害的主要手段,病原菌群体对药剂的敏感性是决定防治效果的主要因素之一。传统的抗药性检测方法是将病原菌分离纯化后,转接在含药培养皿上,根据药剂对病原菌的生长抑制作用来鉴定是否为抗药性菌株,该方法工作量大,耗时长;本研究为了实现抗药性快速检测的目的,建立环介导等温扩增检测(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP),在 1~2 h 内得到可靠的抗药性检测结果,能快速检测和监测病原菌的抗药性发展,从而合理指导用药。

[方法] 针对灰霉病,本研究通过错配碱基引物特异性鉴定抗药性菌株、优化反应组分和条件,从而建立抗药性 LAMP 快速检测体系。最后应用 LAMP 检测技术检测田间样品,同时将样品带回实验室分离培养,利用传统区分剂量法检测抗药性,结果和 LAMP 检测相比较,验证 LAMP 检测结果。针对炭疽病,本研究建立 LAMP 快速检测技术用于草莓苗期炭疽病的检测;随后,测定了草莓炭疽病菌的抗药性,分析其抗性分子机制,建立了草莓炭疽病菌抗药性 LAMP 检测方法。

[结果] 1. 开发了一种环介导的等温扩增(LAMP)检测体系,设计错配引物,能快速检测灰葡萄孢菌 β -tubulin 基因上 E198A 突变基因型(对苯并咪唑类杀菌剂高抗);灰霉病菌 E198A 基因型 LAMP 检测的最佳反应条件为 64℃, 60 min;本研究中 LAMP 灵敏度是常规 PCR 的 10 倍。和区分剂量法的检测结果比较表明 LAMP 检测田间抗性菌株可达到 100%的准确性。2. 建立了 LAMP 快速检测体系,用于田间灰葡萄孢菌对甲氧基丙烯酸酯(QoIs)类杀菌剂的抗性监测和抗性发展风险评估,其中包含两个 LAMP 检测,其一能准确检测到灰霉病菌对 QoI 类杀菌剂具有高度抗性的 G143A 突变体;其二能检测出灰葡萄孢中 *cytb* 基因上 BCbi143 / 144 内含子。LAMP 检测的最佳反应条件为 61℃, 50 min, 使用 ALL-DNA-Fast-Out 在 10 min 内对田间样品进行核提取前处理,以实现一步法快速检测。总之,本研究建立了一个快速灵敏的 LAMP 测定系统,用于灰霉病菌对 QoIs 杀菌剂抗性风险评估和监测田间抗药性。3. 开发了一种直接用于草莓苗

期炭疽病检测的 LAMP 体系，利用 LFD（横向侧流试纸）及碱性聚乙二醇浸提等方法，快速进行田间样品前处理，实现田间病害快速检测。4. 分别建立了 LAMP 快速检测方法，用于特异性检测胶孢炭疽菌对 QoIs 类杀菌剂高抗 G143A 突变基因型和对苯并咪唑类高抗 E198A 的突变体，检测结果和区分剂量法一致。

[结论] 本文研究结果初步实现了田间快速检测草莓主要抗药性病害的目的，对草莓生产上调整用药策略，提高药剂防治效果、减少药剂的使用量具有较大的现实意义。

关键词：灰葡萄孢菌；胶孢炭疽菌；甲基硫菌灵；嘧菌酯；吡唑醚菌酯；抗药性检测；环介导等温扩增检测（LAMP）

ABSTRACT

Strawberry anthracnose is caused by *Colletotrichum gloeosporioides* and *Botrytis cinerea* can lead to strawberry gray mold, which are the main diseases in the agricultural production of strawberry. Chemical control is the main means of preventing and curing anthracnose and gray mold diseases in strawberry production. The level of control effect will depend on the resistance of pathogenic fungi to fungicide. The traditional method for detecting resistance is isolated and purified the pathogen, then transferred to the potato dextrose agar medium containing fungicide, according to the growth inhibition effect of the agent on the pathogen to identify the resistant isolates, which takes 5 to 7 days even extended to a few weeks, and is time-consuming and laborious. To achieve rapid detection of pathogen resistance, Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) was established to obtain reliable detection results within 1 - 2 h, which will rapidly detect and monitor the pathogen resistance and the resistance development, so as to guide the medication reasonably.

[Method] For gray mold disease, the rapid detection of LAMP assays for resistant - pathogen were established in this study. The specificity and mismatched LAMP primers were screened to identify the resistant strains. Components and conditions of LAMP reaction were optimized, then LAMP assay were used to detect field samples of strawberry gray mold and then samples were taken back to the laboratory for isolation and culture, and the traditional distinguishing dosage method was used to test the resistance, the results were compared with the LAMP assay to validate the LAMP assay for the dynamic monitoring of resistant populations and the assessment of resistance risk. For anthracnose, the rapid detection system of LAMP was established for the detection of anthracnose occurrence in strawberry seedling stage, after that, isolates were collected, isolated and detected the resistance of the pathogen by distinguishing dosage method, and the molecular mechanism of resistance was analyzed, based on the above, developing the LAMP assay to rapid detect resistance.

[Purpose] Strawberry anthracnose is caused by *Colletotrichum gloeosporioides* and *Botrytis cinerea* can lead to strawberry gray mold, which are the main diseases in the agricultural production of strawberry. Benzimidazole and Qo inhibitor (QoI) fungicides are frequently used for disease management. However, there are many hosts of *C. gloeosporioides* and *B. cinerea*, at the choice pressure of the fungicide, once the resistance occurs, the level of resistance will develop rapidly for its short life cycle and prolific reproduction rate. And they have characteristics of many mutation sites and latent infection, so the rapid detection and monitoring of pathogen resistance have become particularly important to guide the rational use of fungicides.

[Method] In this paper, the resistance of pathogens was detected by distinguishing dosage method, and the molecular mechanism of pathogen resistance was further explored. The rapid molecular detection system of resistance and latent infection was established: Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) Technology to detect field samples, through the mismatched

base primers specific identification of resistant strains, and the difference between the measurement method of comparison test for the dynamic monitoring of drug-resistant groups, resistance risk assessment study.

[Result] 1. Development a visual technique for the on-site rapid monitoring of carbendazim - resistant *Botrytis cinerea* using loop-mediated isothermal amplification. The LAMP mismatched primers, based on the E198A (GAG→GCG) point mutation, were designed to detect the E198A genotype specifically. HNB acted as a visual LAMP reaction indicator that turned the violet colored into a sky blue color. The detection limit of this assay was 100 copies and 10 times more than PCR. This LAMP assay could be applied to detect *B. cinerea* with the E198A genotype with 100% accuracy compared with distinguishing dosage method. 2. In this study, we established a Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) system for the monitoring and evaluation of the risk of development of *B. cinerea* resistance to QoI fungicides; the method uses two LAMP assays. The first assay detects G143A mutants of *B. cinerea*, which are highly resistance to QoI fungicides. BCb143/144 introns in *B. cinerea* are then detected by the second assay. HNB acts as a visual LAMP reaction indicator. The optimum reaction conditions of the LAMP assays were 61°C for 50 min, and the detection limit of the LAMP assays was 100×10^{-4} ng/μL. We directly pre-treated the field samples by using All-DNA-Fast-Out to extract DNA within ten minutes, then performed the LAMP assay to achieve one-step rapid detection. In conclusion, we established a rapid and sensitive LAMP assay system for resistance risk assessment and for monitoring QoI-resistance of *B. cinerea* in the field. 3. A rapid detection system for direct detection of strawberry anthracnose from plant on the plant body was developed. The field sample pretreatment was quickly carried out by LFD (lateral lateral flow test paper) and alkaline polyethylene glycol extraction for the purpose of detecting strawberry anthrax. 4. The rapid detection system of LAMP was established for the specific detection of *C. gloeosporioides* of the G143A mutant genotype with the high resistance to QoI fungicides and E198A mutant genotype with the high benzimidazole fungicides, respectively. The results are consistent with distinguishing dosage method.

[Conclusion] The results of this study can achieve the purpose of rapid detection of strawberry diseases resistance in field, and it is great practical significance to adjust the strategy of strawberry production, improving the effect of drug control and reducing the dosage of fungicides.

Key words: *Botrytis cinerea*; *Colletotrichum gloeosporioides*; Methyl thiophanate; Azoxystrobin; Pyraclostrobin; Detection of resistance; Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

目录

摘要.....	I
ABSTRACT.....	III
1 文献综述.....	1
1.1 草莓主要病害概述.....	1
1.2 草莓灰霉病及其抗药性.....	1
1.2.1 草莓灰霉病概述.....	1
1.2.2 草莓灰霉病的化学防治.....	2
1.2.3 草莓灰霉病的抗药性.....	2
1.2.3.1 对苯并咪唑类杀菌剂的抗性.....	3
1.2.3.2 对 N-苯基氨基甲酸酯类杀菌剂的抗性.....	3
1.2.3.3 对甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂的抗性.....	3
1.2.3.4 对二甲酰亚胺类杀菌剂的抗性.....	4
1.2.3.5 对苯吡咯类杀菌剂的抗性.....	4
1.2.3.6 对苯胺基嘧啶类杀菌剂的抗性.....	5
1.2.3.7 对琥珀酸脱氢酶抑制剂的抗性.....	5
1.3 草莓炭疽病及其抗药性.....	5
1.3.1 草莓炭疽病概述.....	5
1.3.2 草莓炭疽病的化学防治.....	6
1.3.3 草莓炭疽病抗药性.....	6
1.3.3.1 对苯并咪唑类杀菌剂的抗性.....	6
1.3.3.2 对甾醇脱甲基抑制剂的抗性.....	7
1.3.3.3 对甲氧基丙烯酸酯类 (QoIs) 杀菌剂的抗性.....	7
1.4 植物病原菌抗药性检测技术.....	8
1.4.1 杀菌剂抗药性离体生物测定.....	8
1.4.2 病原菌及其抗药性分子检测.....	8
1.4.2.1 聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	8
1.4.2.2 荧光定量 PCR (Real-time Quantitative PCR Detecting System, qPCR).....	8
1.4.2.3 等位基因特异性寡核苷酸 (Allele Special Oligonutide, ASO) 探针法.....	9
1.4.2.4 单链构象多态性 (Single-Strand Conformation Polymorphism, SSCP) 分析.....	9
1.4.2.5 限制性片段长度多态性聚合酶链式反应 (RFLP-PCR).....	9

1.5 环介导等温扩增 (Loop-Mediated Isothermal Amplification, LAMP) 检测技术.....	10
1.5.1 LAMP 扩增过程.....	10
1.5.2 LAMP 反应体系.....	11
1.5.3 LAMP 技术的检测方法.....	11
1.5.4 LAMP 检测的应用.....	11
1.5.4.1 LAMP 检测细菌.....	11
1.5.4.2 LAMP 检测病毒.....	11
1.5.4.3 LAMP 检测植物病原真菌及其抗药性.....	12
1.6 研究目的和意义.....	12
2 检测草莓灰霉病菌抗苯并咪唑类杀菌剂 E198A 基因型的 LAMP 体系的建立与应用.....	14
2.1 材料方法.....	14
2.1.1 供试材料与仪器试剂.....	14
2.1.2 引物设计.....	15
2.1.3 基因组 DNA 提取.....	16
2.1.4 引物筛选.....	16
2.1.5 LAMP 反应体系的优化.....	16
2.1.6 LAMP 反应条件的优化.....	16
2.1.7 LAMP 灵敏度和常规 PCR 比较.....	17
2.1.8 LAMP 特异性准确度测试.....	17
2.1.9 LAMP 对田间样品的检测.....	17
2.1.9.1 田间草莓灰霉病样品核酸的提取.....	17
2.1.9.2 LAMP 检测.....	17
2.1.9.3 区分剂量法.....	17
2.1.9.4 不同表现型灰霉病菌 <i>β-tubulin</i> 基因的序列比较.....	18
2.2 结果与分析.....	18
2.2.1 LAMP 特异性引物.....	18
2.2.2 Bst DNA 聚合酶量的优化.....	19
2.2.3 dNTPs 浓度的优化.....	20
2.2.4 引物浓度的优化.....	20
2.2.5 甜菜碱浓度的优化.....	21
2.2.6 Mg ²⁺ 浓度的优化.....	21
2.2.7 最终体系确定.....	22
2.2.8 最佳 LAMP 反应条件.....	22

2.2.9 LAMP 检测限	23
2.2.10 LAMP 检测的准确度	24
2.2.11 LAMP 在 1.5h 内检测田间草莓灰霉病的抗药性	25
2.3 讨论	25
3 快速检测和评估草莓灰霉病菌对 QoIs 类杀菌剂的抗性发展	27
3.1 材料方法	27
3.1.1 供试菌株及试剂	27
3.1.2 构建 LAMP 体系中模板 DNA 的提取	27
3.1.4 LAMP 反应体系	29
3.1.5 LAMP 反应条件的确定	29
3.1.6 LAMP 检测灵敏度	30
3.1.7 LAMP 检测的田间应用	30
3.1.7.1 LAMP 检测田间草莓灰霉病样品	30
3.1.7.2 灰霉病菌对啞菌酯的抗性测定	30
3.1.7.3 不同表现型灰霉病菌 <i>cytb</i> 基因的序列比较	30
3.2 结果与分析	30
3.2.1 两个 LAMP 反应的目视检测	30
3.2.2 LAMP 检测最佳反应条件	31
3.2.3 确定 LAMP 最低检测限	32
3.2.4 在 1h 内完成田间草莓灰霉病抗药性的 LAMP 检测	33
3.3 讨论	35
4 草莓苗期炭疽病 LAMP 检测的建立和应用	37
4.1 材料与方​​法	37
4.1.1 主要试剂与仪器	37
4.1.2 引物设计和筛选	37
4.1.3 建立草莓苗期炭疽病 LAMP 检测体系	38
4.1.4 LAMP 特异性测试	38
4.1.5 直接提取草莓植株样品 DNA	38
4.1.5.1 用横向测流试纸 (lateral-flow device, LFD) 直接提取草莓植株组织 DNA	38
4.1.5.2 碱性聚乙二醇 200 (PEG 200) 直接从植株提取 DNA	39
4.1.6 LAMP 对田间草莓植株样品的检测	39
4.2 结果与分析	39
4.2.1 LAMP 检测最佳反应条件的确定	39
4.2.2 LAMP 检测的特异性	40

4.2.4 LAMP 检测验证 LFD 和碱性 PEG 提取植物样品 DNA 可行性	42
4.2.5 LAMP 检测田间草莓炭疽病植株样品	43
4.3 讨论	44
5 草莓炭疽病菌抗 QoIs 类和苯并咪唑类杀菌剂的 LAMP 检测技术	45
5.1 材料与方法	45
5.1.1 供试药剂	45
5.1.2 菌株的采集和分离	45
5.1.3 对杀菌剂的抗性测定方法	45
5.1.4 β -tubulin 基因和 cytb 基因序列比较	45
5.1.5 DNA 的提取	46
5.1.6 LAMP 检测的引物设计和筛选	46
5.1.7 草莓炭疽病抗药性 LAMP 检测体系的建立	47
5.1.8 LAMP 检测体系准确度分析	47
5.2 结果与分析	47
5.2.1 草莓炭疽病菌对杀菌剂的抗药性	47
5.2.2 对 QoIs 类和苯并咪唑类杀菌剂的抗性分子机制	48
5.2.3 LAMP 检测的特异性引物	49
5.2.4 G143A 草莓炭疽病菌 LAMP 检测最佳反应条件	51
5.2.5 G143A 草莓炭疽病菌 LAMP 的检测限	52
5.2.6 G143A 草莓炭疽病菌 LAMP 检测的准确度	53
5.3 讨论	53
6 全文总结	55
参考文献	56
附录	64
个人简介	70
致谢	71

1 文献综述

1.1 草莓主要病害概述

草莓 (*Fragaria ananassa*)，蔷薇科，草莓属，是宿根性多年生常绿草本植物，在园艺学上属于浆果类水果^[1]。全世界草莓属约 24 个种，主要分布于亚洲、南美洲、欧洲等地，其中只有八倍体的凤梨草莓为现代广泛栽培，其他均为野生种。我国分布有 11 个野生草莓种^[2]。我国栽培凤梨草莓开始于 1915 年，栽培历史悠久^[3]。在世界各种浆果中，草莓的栽培面积和产量仅次于葡萄，居第二位。由于草莓收益高，见效快，而且含有丰富的蛋白质和维生素，受到生产者和消费者的喜爱^[4]。近年来，中国草莓种植面积迅速增长，2015 年，中国成为最大的草莓生产国，总种植面积 13 万 hm²，年产量达 350 万 t（农业部 2017 年数据）。

随着草莓消费量的快速上升，促进了草莓栽培产业的迅速发展，种植面积逐渐增加。然而由于产区相对固定，连作危害暴露，病害种类逐年增多，危害程度持续加重，导致经济效益下降。国内外报道草莓上病害主要有草莓炭疽病（胶孢炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides*）、灰霉病（灰葡萄孢菌 *Botrytis cinerea*）、白粉病（羽衣草单囊壳菌 *Sphaerotheca aphans*）、蛇眼病（杜拉柱隔孢 *Ramularia tulasnei*）、“V”型褐斑病（草莓日规壳菌 *Cnomonia fruticola*）、枯萎病（尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum*）、根腐病（立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani*）、根结线虫病（北方根结线虫 *Meloidogyne hapla*）^[6-7]，其中褐斑病、蛇眼病、轮斑病、叶枯病主要为害草莓叶片，对草莓产量影响不大；枯萎病在草莓苗期发病对生产影响大；根腐病主要为害根系，主要影响草莓群体的扩大，影响产量。草莓育苗期主要有炭疽病和多种病原真菌引起的叶斑病；移栽定植阶段主要病害有炭疽病、枯萎病、黄萎病和叶斑病；开花座果期发生灰霉病和白粉病会造成产量严重损失，当土壤温度升高，可引起全株死亡^[8]。

1.2 草莓灰霉病及其抗药性

1.2.1 草莓灰霉病概述

灰霉病是一种常见的真菌性病害，病原物为灰葡萄孢菌 (*Botrytis cinerea* Pers.) 属于半知菌类丝孢纲丝孢目葡萄孢属，是最早被描述的一类真菌，寄生性强，寄主范围广，大约可侵染 270 种寄主。属低温高湿型病害，当温度维持在 18~25 ℃、湿度持续 90 % 以上时为病害高发期^[9]。在草莓生产上，遇到阴雨潮湿的天气，温室湿度大，在草莓开花结果期为害最重，通常会导致草莓减产 20~30 %，严重时高达 50 %^[10]，因此常给草莓种植业带来巨大的经济损失。灰霉病菌主要破坏双叶植物的成熟组织和衰老组织，但也可以在寄主生长初期侵入寄主组织，经过一段长时间的潜伏期后，在环境条件适宜的情况下或者寄主植物

生理状况发生变化时,引起组织的迅速腐烂,因此可引起看似健康的作物在收获时或长距离运输时的大量损失^[11]。草莓灰霉病主要为害草莓的叶片、果实和花蕾等部位。田间湿度较大时,为害部位表面密生灰色的霉层,是灰霉病的典型症状,湿度较小时也易干腐^[12]。侵染花器时,起初花萼呈水渍状针眼大的斑点会扩展成近圆形病斑,并由花萼逐渐延伸侵染子房及幼果,最后导致幼果形成病斑,在空气湿度大的情况下,迅速软腐,并在发病部位产生大量灰褐霉层;果实染病,多发生在未成熟青果上,初期果顶呈水渍状病斑,后不断变为褐色,同时病菌向果肉纵深侵入,空气湿度大时病果湿软腐烂,气候干燥时,病果失水干腐,最后造成果实提早脱落^[13];叶片受害,先是靠近叶柄部基处发病,初呈水渍状继而发展成灰褐色大病斑,有时略具轮纹,最后蔓延到全叶,病部常产生灰褐色霉状物,导致叶片腐烂、枯死和落叶^[14]。

1.2.2 草莓灰霉病的化学防治

灰葡萄孢是条件致病菌,腐生性强,属坏死型植物病原真菌^[15-18],具有潜伏侵染的特点,潜伏期较长。灰葡萄孢的寄主专化性不强,不同寄主植物间的灰葡萄孢可交互侵染,因而很难像专性寄生菌那样发现有效的抗病材料,故而很难培育出抗病品种。但是,利用品种结构上对灰葡萄孢菌的避病性、对低温和弱光的耐性,还是可以达到一定程度上的抗病(耐病)目的^[19]。目前对灰霉病菌的防治主要以化学防治为主^[20]。

灰霉病化学防治最早可以追溯到罗马时期,人们最早开始用硫磺来防治灰霉病,德国也在 1793 年使用硫和钾来防治该病害。20 世纪六十年代以来,开发用于防治灰霉病的药剂主要有苯并咪唑类的甲基硫菌灵(Methyl thiophanate)、多菌灵(Carbendazim)^[21];甲氧基丙烯酸酯类的嘧菌酯(Azoxystrobin);二甲酰亚胺类的腐霉利(Procymidone)、异菌脲(Iprodione);苯氨基甲酸酯类的乙霉威(Diethofencarb);甾醇生物合成抑制剂(SBI)类的 Fenethamal 和 Fenetrazole;苯胺基嘧啶类的有嘧菌环胺(Cyprodinil)、嘧菌胺(Mepanipyrim)和嘧霉胺(Pyrimethanil)^[22]。这些药剂在灰霉病的防治过程中都起到了显著的效果,有的至今仍在大量使用。目前也有国外研究报道,苯基吡咯类杀菌剂咯菌腈(Fludioxonil)以及酰胺类的环酰菌胺(Fenhexamid)对防治灰霉病有很好效果^[23-25]。即便如此,灰葡萄孢极易产生抗药性^[26],这些新开发的药剂同样会受到抗性的威胁。

1.2.3 草莓灰霉病的抗药性

灰霉病菌因具有寄主范围广、繁殖快和遗传变异频繁等特点,使其极易对杀菌剂产生抗性^[27]。国内自 1987 年首次检测到多菌灵抗性菌株以来^[28],已先后报道了其对苯并咪唑类、二甲酰亚胺类、N-苯胺基甲酸酯类和苯氨基嘧啶类杀菌剂的抗性,而且由于各地用药背景的差异,造成了单抗、双抗甚至多抗灰葡萄孢菌

的出现。

1.2.3.1 对苯并咪唑类杀菌剂的抗性

苯并咪唑类杀菌剂是一类作用于真菌微管蛋白的杀菌剂，能抑制孢子芽管分隔和菌丝生长。由于作用靶标特殊，其作用具有高度的选择性。该类药剂从苯菌灵的使用开始进入杀菌剂市场，其他药剂，如可转化形成多菌灵的甲基硫菌灵等也依次被引入使用。随着该类杀菌剂的大量使用，我国已发现了对多菌灵产生高度耐药性的灰霉菌株，并且发现该抗性可稳定遗传^[29]。张传清等对 144 株来自浙江、江苏、辽宁和山东 4 地设施蔬菜上的灰霉病菌菌株对多菌灵的抗性测定结果表明，菌株对多菌灵已有严重的抗性产生，其中高水平抗性（HR）亚群体已经成为优势种群，并认为苯并咪唑类药剂已经失去防治灰霉病的价值，继续使用这类药剂，不但会显著增加经济和环境成本，也无法获得满意的防治效果^[30]。

大量研究结果表明，病原真菌对苯并咪唑类药剂抗性的产生主要是因为 β -tubulin 基因的点突变，该基因转录翻译的蛋白上的第 198 位谷氨酸（E198A/G/K/V）^[31]和 200 位苯丙氨酸（F200Y）的不同点突变引起病菌对多菌灵等苯并咪唑类药剂不同程度的抗药性^[32-34]。

1.2.3.2 对 N-苯基氨基甲酸酯类杀菌剂的抗性

以乙霉威为代表的 N-苯基氨基甲酸酯类杀菌剂于 80 年代开发使用^[35]。乙霉威本身不治灰霉病，但却能抑制对多菌灵产生抗性的灰霉病菌，与苯并咪唑类杀菌剂有负交互抗性，作用于微管蛋白而抑制有丝分裂，从而达到控制灰霉病菌的目的。随着使用年限的增加，1998 年就有检测到对多菌灵和乙霉威菌产生双重抗性的灰霉菌株的报道^[36]。之后也检测到对多菌灵、速克灵和乙霉威均有抗性的灰霉菌株^[37-38]。灰霉病菌 β -tubulin 基因的第 198 位氨基酸不发生突变时，抗乙霉威而对多菌灵敏感；198 位氨基酸发生突变时，抗多菌灵而对乙霉威敏感^[78]；抗乙霉威且中抗多菌灵时，灰霉病菌第 200 位氨基酸由苯丙氨酸突变为酪氨酸^[39]。

1.2.3.3 对甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂的抗性

甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂（QoIs）是一类来源于具有杀菌活性的天然抗生素 strobilurinA 的杀菌剂，包括啞菌酯、醚菌酯、吡唑醚菌酯等，具有广谱高效的抗菌活性^[40]。由于其具有独特的作用靶标，与其它现有杀菌剂不存在交互抗性。甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂作用于真菌线粒体呼吸链上的复合体 III，通过与 *cytb* 基因编码的 *cytb* 的 Qo 位点结合来抑制呼吸链上的电子传递，进而影响呼吸作用阻碍病原真菌的合成，干扰细胞正常分裂和生长，进而造成菌体死亡^[41]。

从 1996 年欧洲开始使用甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂防治小麦白粉病到现在，灰霉病菌对啞菌酯等 QoIs 药剂产生了明显的抗药性。据报道，*cytb* 基因上的点突变 G143A、F129L 和 G137R 可以引起灰霉病菌对 QoI 药剂不同水平的抗药性，含有点突变 G143A 的菌株表现为高抗，而含有点突变 F129L 和 G137R 的菌株表

现为中抗^[42]。但是，灰霉病菌田间抗性的产生主要是因为点突变 G143A，药剂压力可以提高 G143A 突变基因的频率，而且该点突变引起的抗性水平稳定^[43]。也有研究表明灰霉病菌中存在 2 种类型的 *cytb* 基因：I 型 *cytb* 基因在第 143 位密码子后紧跟内含子；II 型 *cytb* 基因在第 143 位密码子后没有紧跟内含子。大多数的灰霉病菌菌株属于 II 型。I 型菌株均为嘧菌酯敏感菌株，II 型菌株为嘧菌酯敏感菌株或抗性菌株，且抗性菌株的 *cytb* 基因的第 143 位密码子由甘氨酸（GGC）突变为丙氨酸（GCC），抗药性机制为 G143A^[44]。

1.2.3.4 对二甲酰亚胺类杀菌剂的抗性

二甲酰亚胺类杀菌剂(DCFs)是 70 年代开发的一类杀菌剂。2004 年, Kojima 等首次报道了该类杀菌剂可以激活真菌的双组分组氨酸激酶信号途径(TCHK 信号途径)^[45]。丝状真菌中的 TCHK 信号途径参与调控菌株对渗透压、二甲酰亚胺类杀菌剂的敏感性，其中 TCHK 信号途径中的组氨酸激酶 OS1 元件被普遍认为是 DCFs 药剂的作用靶标。

作为对灰葡萄孢的高效杀菌剂，二甲酰亚胺类杀菌剂取代了苯并咪唑类杀菌剂而得到广泛应用，但不久就出现抗药性问题。Leroux 于 1977 年首次得到了抗二甲酰亚胺类杀菌剂的灰葡萄孢菌突变体，80 年代初，德国和法国的葡萄园中已有 60%~80% 的菌株对二甲酰亚胺类杀菌剂产生了抗药性^[46]。我国引进这类杀菌剂的时间并不很长，主要用于防治果树和蔬菜病害。Leroux 等认为，灰葡萄孢田间抗性菌株在其双组分组氨酸激酶基因编码的第 365 位氨基酸发生了突变，可能与真菌的渗透调节有关^[46]。Ma 等对灰葡萄孢菌野生敏感菌株和野生抗二甲酰亚胺类药剂菌株的双组分组氨酸激酶基因(*BOS1*)进行比较发现，不同位点的碱基突变导致了菌株抗药性的产生，有的第 365 位氨基酸由异亮氨酸突变成丝氨酸或天冬酰胺；有的第 369 位氨基酸由谷氨酰胺突变成脯氨酸；有的第 373 位氨基酸由天冬酰胺突变成丝氨酸^[47]。此外，*BOS1* 基因上的氨基酸点突变 I365S/N、V368F、Q369H、T447S、Q369P、N373S 和 1040 位的缺失都可以引起灰霉病菌对 DCFs 的抗药性^[34]。这表明灰霉菌抗二甲酰亚胺类药剂相关的 *BOS1* 基因突变具有多样性。

1.2.3.5 对苯吡咯类杀菌剂的抗性

苯吡咯类杀菌剂是一类由假单胞杆菌的天然产物——硝吡咯菌素改造而来的新型高效广谱的内吸性杀菌剂，包括咯菌腈和拌种咯，可以抑制灰霉病菌孢子的萌发和菌丝体的生长，该类药剂与二甲酰亚胺类药剂的抗菌谱相似，并且二者之间存在正的交互抗性。现在普遍认为咯菌腈的作用机理是作用于渗透压调节信号相关的组氨酸激酶，通过影响其活性，进而起到杀菌作用。

到目前为止，只有 2013 年在弗吉尼亚州和马里兰，以及加利福尼亚州南部有报到发现极少量的咯菌腈抗性灰霉菌株，但是也只是低到中等抗性的菌株，还未发现田间对咯菌腈的高抗菌株^[48]。

1.2.2.6 对苯胺基嘧啶类杀菌剂的抗性

苯胺基嘧啶类杀菌剂在 20 世纪 90 年代中期引入欧洲，进而开始被使用。该类药剂对灰霉菌的孢子萌发没有影响，但是可以抑制萌发孢子的芽管伸长和菌丝生长，抑制离体菌丝内甲硫氨酸的生物合成。目前已知灰葡萄孢对这类药剂的抗性主要由单基因控制^[49]。但目前尚不清楚确切机理，在田间发现的灰霉病菌对该类药剂产生抗性的三种表现型 AniR1, AniR2, AniR3 分别由主效基因 *ANI1*, *ANI2*, *ANI3* 控制。AniR1 表现为对苯胺基嘧啶类药剂有中高度抗性；AniR2 和 AniR3 则主要表现在芽管伸长阶段对杀菌剂的抗性；AniR1 的 *METB* 基因的第 70 和 190 位的突变引起对应氨基酸的点突变 S24F 和 I64V，致使胱硫醚 γ -合成酶对甲硫氨酸抑制不敏感，甲硫氨酸生产过剩，进而产生抗性，但这种假设仍未得到证实^[50]

1.2.3.7 对琥珀酸脱氢酶抑制剂的抗性

以啉酰菌胺为代表的琥珀酸脱氢酶抑制剂于 90 年代开发使用，广泛应用于灰霉病害的防治，该类药剂抑制真菌线粒体内膜呼吸链上的复合体 II 琥珀酸-CoQ 还原酶，即琥珀酸脱氢酶的活性，影响呼吸链中的电子传递，进而阻碍三羧酸循环，影响能量和组成细胞的基本物质的产生，干扰细胞的分裂和生长^[51]。啉酰菌胺在较低浓度下就可以抑制芽管的伸长，但是只有在高浓度的情况下才可以抑制孢子的萌发。皇甫运红研究表明对啉酰菌胺敏感的灰霉菌株的 *SdhB* 基因序列的 244 位氨基酸为丝氨酸（Ser, S），277 位氨基酸为组氨酸（His, H），而抗性菌株 244 位氨基酸则是苏氨酸（Thr, T），277 位为酪氨酸（Tyr, T）或精氨酸（Arg, R）即推测抗药性分子机制为 *SdhB* 基因的 S244T 突变和 H277T（或 H277R）双重突变^[52]，其中 277 位上的突变与国外报道一致^[53]。

1.3 草莓炭疽病及其抗药性

1.3.1 草莓炭疽病概述

Brooks 最早报道了发生在美国佛罗里达州的为害草莓匍匐茎和叶柄的草莓炭疽病^[54]。Mass^[55]认为草莓炭疽病由 *Colletotrichum fragariae*（草莓炭疽菌）、*C. dematium*（黑线炭疽菌）、*C. acutatum*（尖孢炭疽菌）、*C. gloeosporioides*（胶孢炭疽菌）等 4 种病原菌引起。但是目前被普遍认可的是由 *C. acutatum*、*C. fragariae*、*C. gloeosporioides* 等 3 种病原菌引起了草莓炭疽病^[56]，而 *C. dematium* 黑线炭疽菌在草莓上发现不多，可引起草莓果实腐烂^[57]。但最近的一项研究表明，先前被认为是草莓炭疽病病原菌的 *C. gloeosporioides*，实际上是一种复合种，

且我国草莓炭疽病主要就是由 *C. gloeosporioides* 复合种引起的, *C. acutatum* 导致的炭疽病在我国发生极少^[58-60]。韩国兴对来自杭州市建德和下沙草莓基地的 63 个菌株进行培养性状、形态学和种特异性引物 PCR 鉴定, 表明所有的菌株均属于胶孢炭疽菌 *C. gloeosporioides*。因此, 认为杭州市草莓炭疽病菌是属于胶孢炭疽菌 *C. gloeosporioides*^[61]。

目前, 草莓炭疽病已经成为了草莓的主要病害, 并且在许多国家均有发生。我国草莓炭疽病主要分布在温暖的南方地区, 浙江和上海发生较重。炭疽病可以发生在草莓生产上的整个生产周期中, 特别是苗期和移栽阶段。*Colletotrichum* spp. 可能导致草莓植株各个部位发生病变, 而以短缩茎、匍匐茎、叶柄最易受害, 湿度高时病部可见粉红色分生孢子堆, 在发生严重情况下导致植物坍塌和死亡^[59]。炭疽菌具有一定潜伏侵染特性, 无病健康的组织普遍带菌, 当条件适宜时入侵的侵染丝发育成菌丝, 扩展引起发病^[62]。显微结构下寄主与病原体的相互作用, 炭疽菌属真菌在穿透寄主表皮结构之前是相同的, 包括孢子落在植物表面, 孢子附着在植物体上, 孢子萌发, 产生附着胞, 穿透植物表皮, 在植物组织内增殖, 产生分生孢子盘和分生孢子。在这之后开始显现不同, 包括活体营养型阶段和死体营养型阶段^[63]。

1.3.2 草莓炭疽病的化学防治

炭疽病主要发生在育苗期, 该病发生适温 28-32 °C, 属于高温型病害, 7-8 月的高温高湿环境利于该病的发生。选育抗病品种防控草莓炭疽病是最经济有效的途径。在大部分地区, 除种植一些高抗品种外, 种植者都要依靠一些药物进行病害防控, 但随着炭疽菌抗药性的不断增强, 杀菌剂防治炭疽菌的效果都不太理想。防治植物炭疽病目前常用药剂有: 传统的保护性杀菌剂, 有机硫类和芳香类杀菌剂, 登记在葡萄炭疽病上的药剂有福美双、福美锌、福美肿、代森锰锌、代森锌、代森联、丙森锌、退菌特和百菌清等^[64-65], 这类杀菌剂杀菌剂具有作用位点多, 杀菌谱广的特点, 因作用位点多不易引起病原菌产生抗药性, 多与内吸性杀菌剂混配, 在延缓和治疗内吸剂抗药性上起着重要作用; 常用的内吸性杀菌剂有多菌灵、抑霉唑、戊唑醇、咪鲜胺、烯唑醇和腈菌唑等^[66-67]。Pavan 等报道了一种杀菌剂喷雾应用程序系统在草莓炭疽病上的应用, 该系统主要包括天气监测和预报炭疽病发病率, 帮助种植者降低喷药次数及费用^[68]。生产上为了延缓草莓炭疽病的抗药性和提高防治效果, 建议在防治草莓炭疽病的药剂选择上可使用 2~3 种不同杀菌机理的杀菌剂混合与交替使用。

1.3.3 草莓炭疽病的抗药性

1.3.3.1 对苯并咪唑类杀菌剂的抗性

这类杀菌剂由于作用位点单一, 单一品种连续使用, 很容易产生抗药性。杀菌剂抗药性行动委员会 (FRAC) 将这类杀菌剂其归为高风险类^[69], 同类之间易

产生交互抗药性。李洋等对辽宁省葡萄炭疽菌对多菌灵敏感性测定显示,某些地区已产生了抗药性较强的菌株^[70]。叶佳等研究浙江地区的葡萄炭疽菌群体,结果显示对甲基硫菌灵产生了严重的抗药性^[71]。Sanders 等的研究显示,在芒果和鳄梨上的胶孢炭疽菌群体中也产生了对苯并咪唑类杀菌剂的抗性菌株,高抗菌株的 β -tubulin 基因的 198 位的 GAG 被替换为 GCG,中抗菌株的第 200 位 TTC 被替换为 TAC^[72]。这些情况说明,由于多菌灵为代表的苯并咪唑类杀菌剂的大量使用,导致炭疽菌抗性菌株频率增加,抗药性在胶孢炭疽菌中普遍发生。陈聃等对浙江省葡萄炭疽菌抗药性研究表明,田间出现同时抗苯并咪唑类杀菌剂和乙霉威的双重抗药性菌株,双重抗药性菌株均为密码子第 200 位从 TTC 突变为 TAC,导致第 200 位的氨基酸从苯丙氨酸 (Phe) 变为酪氨酸 (Tyr)^[73],这与前人有关植物病原真菌在 β -tubulin 基因密码子第 200 位发生突变会导致对苯并咪唑类杀菌剂和乙霉威产生双重抗药性的结果是一致的。

1.3.3.2 对甾醇脱甲基抑制剂的抗性

以戊唑醇、烯唑醇和腈菌唑等为代表的甾醇脱甲基抑制剂 (DMI) 的作用位点是 C14-脱甲基酶 (Cyp450 加单氧酶),即抑制麦角甾醇中间体的氧化脱甲基反应。麦角甾醇是真菌细胞膜的重要组分,阻止麦角甾醇的生物合成,对细胞膜的完整性、流动性和细胞的抗逆性都会造成影响^[74]。DMI 类杀菌剂相对苯并咪唑类杀菌剂的抗药性风险较低^[75]。叶佳等 2012 年研究表明,浙江省葡萄炭疽菌对戊唑醇产生了敏感性分化^[71]。陈聃 2013 年报道称,浙江葡萄炭疽病菌对戊唑醇的抗性水平迅速提高,敏感性分化较为明显^[73]。邓维萍等报道了云南省葡萄炭疽病菌对 3 种麦角甾醇脱甲基抑制剂的敏感性,对烯唑醇和腈菌唑已经出现了敏感性降低的菌株^[76]。

已经报道 DMI 类杀菌剂具有三种类型的抗药性机制。第一类是 14 α -脱甲基酶 (CYP51) 基因上的突变,CYP51 基因在 136 位的突变,即苯丙氨酸被酪氨酸取代 (Y136F) 导致葡萄白粉病对三唑醇的抗药性产生^[77];第二类是 14 α -脱甲基酶 (CYP51) 基因的过表达。靶标基因的过量表达通常由启动子区的插入突变所引起,如桃褐腐病菌中,65bp 序列的插入导致抗药性产生^[78];第三类是真菌对杀菌剂的外排能力增加,主要包括 ABC (ATP binding cassette) 和 MFS (major facilitator superfamily) 外排系统,外排能力的增加是相关运输体基因表达上升所致,其结果导致菌体内药物积累下降。这类抗性通常具有多药抗性,这在研究灰霉病菌和叶枯菌的抗药性菌株中均发现^[79]。

1.3.3.3 对甲氧基丙烯酸酯类 (QoIs) 杀菌剂的抗性

在甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂开发和使用早期,对其抗药性风险的研究认为这类药剂为中等抗药性风险。实际上在这类杀菌剂应用两年后就产生了抗药性,且防治效果下降。现已归为高抗药性风险^[80-81]。有报道称甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂醚菌酯对葡萄炭疽病的防效不理想^[71],也有检测到对啞菌酯高抗的瓜类炭疽菌的

报道^[82]。植物病原菌对 QoIs 类杀菌剂产生抗药性的机理主要是病原菌 *cytb* 基因 DNA 序列上的 G143A、F129L 和 G137R 氨基酸残基发生单点突变或旁路氧化途径被启动^[83]。

1.4 植物病原菌抗药性检测技术

在植物病害的研究中,病原真菌的早期诊断和抗药性预警是植物病害防治中的关键步骤,对防治措施的制定具有极为重要的意义。植物病原真菌的检测主要依赖于传统的生物学分离纯化及形态学鉴定,抗药性检测则是在含药培养基上接种纯化病原菌,观察药剂对病原菌的生长抑制作用,来判断是否为抗性菌株,必要时运用分子检测等手段。

1.4.1 杀菌剂抗药性离体生物测定

常规的抗药性检测方法,首先通过组织或者单胞分离纯化病原菌,之后在含不同浓度的药剂的培养基上培养,根据不同浓度药剂对菌丝生长的抑制作用鉴定是否为抗性菌株,包括菌丝生长法和区分剂量法。该方法要求病原菌易于离体培养,菌丝生长较迅速、整齐,菌饼的制备和培养基配制较易;优点是结果准确可靠,但具有检测周期长的特点,整个检测过程可能长达数周,甚至会错过当前生产季,不能达到及时监测的目的。

1.4.2 病原菌及其抗药性分子检测

1.4.2.1 聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR)

聚合酶链式反应 (PCR) 以及基于 PCR 的一系列分子检测手段是当前病原菌及其抗药性检测中最常用的方式。利用根据靶标基因,设计特异性 PCR 引物进行 DNA 扩增,根据扩增产物来判断目标病原菌 DNA 的存在。之前有研究报道利用香蕉炭疽病菌 (*C. musae*) *ITS* 特异引物,可以从香蕉炭疽菌株中扩增出 382 bp 的特异性片段^[84];根据苹果炭疽菌 (*C. gloeosporioides*) rDNA 的 *ITS* 基因设计特异性引物,仅能从苹果炭疽菌中扩增出 232 bp 的特异性条带,同时可以从苹果炭疽菌接种的离体苹果病组织上,特异性地扩增出同样大小的条带^[85]。对于利用 PCR 检测抗药性,直接测序可以测出 DNA 序列中的所有突变位点的碱基替代情况,但该方法需要昂贵的仪器和较长的步骤,成本较高。Siah 等基于小麦壳针孢 (*Zymoseptoria tritici*) *cytb* 基因 143 位点突变 G143A,设计了错配 PCR 引物,可以使突变菌株 (QoIs 抗性) 扩增出 302 bp 的条带,敏感菌株扩增出 639 bp 的条带,可以特异性区分出抗性和敏感菌株^[86]。利用 PCR 检测灰葡萄孢菌 (*B. cinerea*) 和苹果黑星病菌 (*Venturia inaequalis*) 对苯丙咪唑类杀菌剂的抗性也有报道^[87-88]。

1.4.2.2 荧光定量 PCR (Real-time Quantitative PCR Detecting System, qPCR)

荧光定量 PCR (qPCR) 是指 PCR 反应体系中加入荧光基团,所使用的荧光化学试剂分为 2 种: TaqMan 荧光探针和 SYBR 荧光染料,利用荧光信号累积实

时监测整个 PCR 进程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。qPCR 能将核酸扩增、杂交、光谱分析和实时检测技术融合在一起,具有快速、灵敏度高、高通量、特异性强、重复性好、准确定量等特点。

目前 qPCR 技术在植物病害诊断和检测中广泛应用。早在 1999 年, qPCR 技术首次用于植物病原真菌的检测;目前已经有研究报道,应用 qPCR 技术成功对引起马铃薯立枯病的病原菌立枯丝核菌进行了快速监测和绝对定量^[89]。Filion 等开发出的实时荧光探针 qPCR 实现了同时对土壤中茄镰孢菜豆变种 (*Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*) 和丛枝菌根真菌 (*Glomus intraradices*) 进行定量检测^[90]。Fraaije 等建立定量荧光定量 PCR 用于对小麦颖枯病菌和锈病菌对甲氧丙烯酸酯类 (QoIs) 杀菌剂 G143A 抗性突变基因型进行检测,对杀真菌剂抗性基因型进行早期检测^[91]。

1.4.2.3 等位基因特异性寡核苷酸 (Allele Special Oligonutide, ASO) 探针法

ASO 是一种以杂交为基础对已知突变的检测技术,以 PCR 和 ASO 相结合,设计一段 20bp 左右的寡核苷酸片段,其中包含了发生突变的部位,以此为探针,与固定在膜上的 PCR 扩增的样品 DNA 杂交,同时以野生型探针为对照,如出现阳性杂交带,则表明样品中存在与该 ASO 探针相应的点突变, Wheeler 等根据 *Rhynchosporium secalis* 对苯菌灵的抗性是由于 β -tubulin 基因上第 198 位发生点突变 (GAG→GCG),设计了 ASO 探针,根据各个 *R. secalis* 菌株的 DNA 在尼龙膜上结合的 ASO 类型,来检测抗药性或敏感性菌株^[92]。

1.4.2.4 单链构象多态性 (Single-Strand Conformation Polymorphism, SSCP) 分析

单链构象多态性 (SSCP) 作为一种检测基因突变的方法由 Orita 首先提出^[93],其原理是单链 DNA 的构象差异会导致其在凝胶电泳中的迁移率变化。DNA 的一级序列决定高级结构,单碱基差异的单链 DNA,其构象是不同的,在凝胶电泳中具有不同的迁移率。因此,SSCP 的基本流程是:首先采用特异引物进行 PCR 扩增待测基因 DNA 片段;然后,对扩增产物进行变性处理,得到具有二级构象的单链 DNA;最后,在非变性的聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳。由于构象和所带电荷的差异,突变基因与正常基因迁移率不同而被分开,基因的多态性得以检测和鉴定。Ishii 等首先将 SSCP 技术用于检测日本梨黑星病菌 (*V. nashicola*) 对苯并咪唑类杀菌剂的抗药性^[94]。

1.4.2.5 限制性片段长度多态性聚合酶链式反应 (RFLP-PCR)

PCR - RFLP 是在 PCR 的基础上,对特异片段进行切割,如果酶切位点发生了突变,便不能被切割;片段是否被切割可以通过琼脂糖凝胶电泳法检测。Malandrakis 等利用 RFLP-PCR 对田间桃褐腐病菌 (*Monilinia laxa*) 突变情况进行分析,能特异性检测苯并咪唑类抗性 E198A 突变基因型^[95]。Ziogas 将 RFLP-PCR 技术用于灰葡萄孢菌 (*B. cinerea*) 对苯并咪唑类杀菌剂抗性的检测^[96]。

1.5 环介导等温扩增（Loop-Mediated Isothermal Amplification, LAMP）检测技术

环介导等温扩增（Loop-mediated isothermal amplification, LAMP）是于 2000 年由 Notomi 等首次发明、报道的一种新型、方便快捷、灵敏度极高且廉价的核酸扩增方法^[97]，该方法引物设计原理是针对靶序列 300 bp 内的 6 个高度保守区域（F3c, F2c, F1c, B1, B2, B3 区）特异性的设计 4 条引物。引物的设计是该方法能否成功扩增的关键，FIP 是上游内引物（由 F1c 和 F2 区域组成），其中 F2 区域与目的基因 F2c 区域互补；F3 是上游外引物，与目的基因的 F3c 区域互补；BIP 是下游内引物（由 B1c 和 B2 区域组成），其中 B2 区域与目的基因 B2c 区域互补；B3 作为下游外引物与目的基因的 B3c 区域互补（图 1.1）。

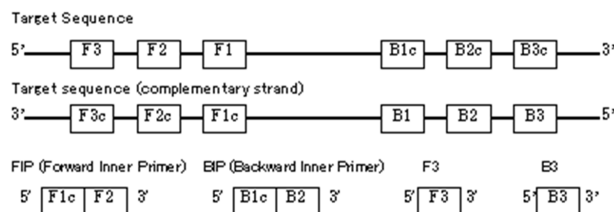


图 1.1 LAMP 引物示意图

Figure 1.1 LAMP primer

有研究报道发现，如果在 LAMP 扩增反应引物中再增加 2 条环状引物（结合区域在 F2, F1 之间和 B2, B1 之间），就可以加快反应速度，缩短 LAMP 的反应时间，提高了检测效率^[98]。

1.5.1 LAMP 扩增过程

LAMP 扩增过程共包括起始阶段和扩增阶段。首先起始阶段，引物 FIP 中的 F2 先与待扩增片段上 F2c 结合，开始核酸合成扩增，之后 F3 与 F3c 结合引起链取代扩增，同时释放 FIP 引导的产物链 1，产物链 1 上 F1c 与 F1 配对成环；引物 BIP 中的 B2 与产物链 1 上的 B2c 结合，再引发核酸合成，随后 B3 与 B3c 结合引发链取代扩增，释放 BIP 引导的产物链 2。产物链 2 两端的 B1c 和 B1, F1c 和 F1 都可成环，形成哑铃状单链，F1c 端可通过自引导补齐中间单链缺口，使哑铃状单链转化成双链茎环结构，此产物作为下一阶段起始物。循环阶段，引物 FIP 与循环起始茎环结构结合，以双链中一条链为模板延伸，释放出另一条链，其 3' 端自身成环，引发链延伸取代并释放上一步 FIP 引导合成的链，两产物均可作为下一循环的起始物，引物 BIP 和 FIP 与茎环结合，重复以上延伸过程，使产物延长同时释放新的链成环并作为新的起始物。终产物为一系列长度不同双链 DNA，在凝胶电泳结果上显示梯形条带^[97]。

1.5.2 LAMP 反应体系

LAMP 反应体系组分一般包含：链置换型 DNA 聚合酶（Bst DNA polymerase）、反应缓冲液、dNTPs、 Mg^{2+} 、LAMP 特异性引物、甜菜碱（Betaine）、显色指示剂和 DNA 模板，LAMP 混合液在等温（65℃左右）设备中孵育，即可进行扩增反应。其扩增效率极高，在短短 30 min~60 min 内能实现 $10^9 \sim 10^{10}$ 倍的扩增。

1.5.3 LAMP 技术的检测方法

LAMP 反应过程会析出大量焦磷酸根离子，其与反应液中的 Mg^{2+} 结合，形成乳白色焦磷酸镁沉淀，焦磷酸镁的产生量与扩增产物量成正比关系，即可判断靶序列是否存在。因此，可以通过观察反应液中是否形成白色混浊来判断靶序列是否存在。

同时，可在反应液中添加适当的核酸染料和金属离子指示剂，通过指示反应液颜色变化，来判断反应结果。常使用的指示剂有钙黄绿素（Calcein）、HNB（羟基萘酚蓝）和 SYBR Green I。反应终止时，在 LAMP 反应管中加入 SYBR GreenI 或钙黄绿素（Calcein）后，如果含有扩增产物，反应体系颜色变绿，反之则保持橙色不变；若加入 HNB，阳性反应结果会由紫色变成天蓝色^[99]。其中 HNB（羟基萘酚蓝）和 SYBR Green I 检测敏感度极高，是钙黄绿素的 10 倍^[100]。从扩增原理可知，扩增过程中会产生大量大小不一的片段（即茎环 DNA），当用的琼脂糖凝胶对扩增产物进行电泳检测时，会出现一系列呈梯状的电泳条带，因此，也可以利用琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物，来判断是否进行扩增。

Mori 等研究了发现在 LAMP 反应开始 15-30 min 内，DNA 的合成量与反应体系的浊度之间呈线性关系，可以根据反应体系浊度的变化对 LAMP 反应进行实时定量监测^[101]。日本学者已经利用这一特性研制出了用于 LAMP 反应检测的实时浊度仪，可实现对 LAMP 反应的实时定量监控，亦可对被检测 DNA 模板进行定量分析。

1.5.4 LAMP 检测的应用

1.5.4.1 LAMP 检测细菌

Hill 等，以大肠杆菌 *malB* 基因的保守序列为靶基因设计 LAMP 引物用以检测尿液中大肠杆菌，8 种革兰氏阴性细菌和 6 种革兰氏阳性细菌检测结果均阴性，提示具有较好的特异性^[102]。Savan 等报道了 LAMP 检测养殖水体中的水产病原菌是迟钝爱德华氏菌（*Edwardsiella tarda*），根据其溶血素基因序列设计 4 条引物，成功地扩增了迟钝爱德华氏菌的溶血素基因^[103]。

1.5.4.2 LAMP 检测病毒

自 Ihira 等用 LAMP 成功地检测了人疱疹病毒 6 型和 7 型毒株之后，又用 LAMP 对 SARS、人流感病毒、新城疫病毒、口蹄疫病毒等许多病毒进行了检测

性研究^[104-107]。Notomi 等人首先将 LAMP 与反转录 (RT) 相结合建立了单管 RT-LAMP 技术, 使反转录和等温扩增在同一反应管中进行^[108]。

1.5.4.3 LAMP 检测植物病原真菌及其抗药性

LAMP 技术在真菌检测领域的研究相对较少, 从已有研究表明, LAMP 检测同样适用于真菌的检测^[109], 赵伟以 *Ypt1* 为靶标设计出的 LAMP 快速检测辣椒疫霉, 此方法可为辣椒疫霉所致病害的早期预警提供可靠的技术支撑^[110]。国内也有利用 LAMP 技术检测其他植物病原菌的报道, 例如大豆核盘菌、柑橘黄龙病菌、灰霉病菌等^[111-113]。

在植物病害抗药性早期风险评估、抗药性治理中, 植物病原菌的抗药性检测是关键环节。LAMP 快速检测技术特异性高, 4 条引物针对 6 个不同的区域, 任何一个区域不能匹配反应就无法进行, 因此特别适合用于抗药性单点突变病原菌的检测, 而且由于其简便、快速、准确、廉价、以及不需要特定实验仪器就能快速完成检测, 所以更适用于在田间现场检测或基层部门应用, 为生产中病原菌群体对药剂抗性风险发展的动态监测、抗药性植物病害的流行预测及植物病害的综合防控提供用药指导。

目前, 国内外针对物病原物抗药性, 利用 LAMP 检测方面的研究少有报道, 国内段亚冰等利用以小麦赤霉病菌对多菌灵抗药性基因型 F167Y 的 β_2 -*tubulin* 基因为靶标, 经过人工错配, 设计并筛选特异引物建立了基于 LAMP 技术快速检测小麦赤霉病菌对多菌灵抗药性方法体系^[114]; 以核盘菌对多菌灵高抗基因型 E198A 的 β -*tubulin* 基因为靶标, 设计 LAMP 引物, 进行对抗苯并咪唑类杀菌剂核盘菌的 LAMP 快速检测, 在检测的 1491 个菌株样品中, 发现有 614 个 (41.18%) 样品呈 LAMP 阳性反应, 和传统抗性检测相比结果更准确可行^[115]。其研究为抗药性流行预警、抗药性治理提供丰富的理论数据和参考资料, 在生产上具有重要的现实意义。

1.6 研究目的和意义

随着对草莓消费量的快速上升, 栽培面积不断扩大, 但草莓病害种类逐年增多, 危害程度不断加重, 主要由胶孢炭疽菌 (*C. gloeosporioides*) 引起草莓炭疽病和由灰葡萄孢菌 (*B. cinerea*) 引起的草莓灰霉病是草莓生产上两大主要病害, 其发生情况受气候条件影响比较大, 如果不及时采取合理的预防和治疗措施, 将对草莓的收成产生不可估量的影响。炭疽菌和灰霉菌寄主繁多, 与寄主之间协同进化以及受杀菌剂的过量使用等因素的作用, 抗药性产生严重, 突变较多且均具有潜伏侵染的特点。因此, 对这些变化进行跟踪、检测并通过了解病原菌的抗药性分子机制来建立抗药性和潜伏侵染的快速分子检测体系: 环介导等温扩增 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 检测技术, 来特异性鉴定抗药性菌

株，用于抗药性群体的动态监测、抗性风险评估研究，及时调整用药策略，提高药剂防治效果、减少药剂的使用量具有较大的现实意义。

2 检测草莓灰霉病菌抗苯并咪唑类杀菌剂 E198A 基因型的 LAMP 体系的建立与应用

苯并咪唑类杀菌剂 (BEN) 是第一批具有治疗活性的杀菌剂, 随着使用年限的增加, 抗药性问题产生严重^[29, 116-117]。目前, 基于环境友好和可持续控制的目的, 要求更加灵活地使用杀真菌剂以延缓或治理抗性。因此, 监测抗药性发展是灰霉病综合防治的重要前提。

传统检测抗药性检测, 须首先通过组织或者单胞分离纯化病原菌, 之后在含药培养基上培养, 根据药剂对菌丝生长的抑制作用鉴定是否为抗药性菌株。该方法结果准确可靠, 但具有检测周期长的特点, 不能达到及时监测的目的^[112-113, 118]。基于聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 等一系列分子检测手段, 也是体外扩增特定基因来检测抗药性突变体的最常用方法, 检测需要精确的热循环仪器及繁琐的电泳过程, 不能脱离实验室的环境进行检测。

环介导等温扩增 (Loop-Mediated Isothermal Amplification, LAMP), 是一种相对较新的、快速的核酸扩增技术, 不需要精密的热循环仪, 因此适用于田间现场检测。目前 LAMP 检测已被用于检测几种植物病原真菌, 包括 *Magnaporthe oryzae*^[119], *Erysiphe necator*^[120], *Sclerotinia sclerotiorum*^[121]。最近, 基于 LAMP 的检测技术被证明能够区分在禾谷镰刀菌 F167Y 突变和核盘菌中对多菌灵具有抗性的 F200Y 突变基因型^[112-115]。之前的研究报道表明灰霉 E198A 突变体在抗 BEN 的亚群中占主导地位 (94.7%)^[18]。

本章研究中, 开发了一个 LAMP 检测体系, 以快速现场检测草莓灰霉病菌 (*B. cinerea*) 抗苯并咪唑类杀菌剂 E198A 突变体, 可以用于抗药性发展的监测。

2.1 材料方法

2.1.1 供试材料与仪器试剂

建立 LAMP 检测所用菌株: 灰葡萄孢菌 (*B. cinerea*) TM-10 为对苯并咪唑类杀菌剂敏感, 灰葡萄孢菌 (*B. cinerea*) CL-3 为田间采集到的多菌灵抗性菌株, 在 β -tubulin 的 198 位存在点突变 (Glu, GAG→GCG, Ala), 用作建立 LAMP 检测体系的模板。田间草莓灰霉病样品: 从浙江省嘉兴市嘉善县、杭州市建德市、杭州市下沙区、杭州市临安区、绍兴市诸暨市、和嘉兴市桐乡市六地设施草莓上, 采集患灰霉病的病果, 用于 LAMP 检测的田间验证。

LAMP 体系试剂: *Bst* DNA Polymerase Large Fragment (NEB)、10×Thermopol (NEB)、甜菜碱和羟基萘酚蓝 (HNB) (Sigma)、MgCl₂ 和 DL2000 Marker (生工生物)。

供试药剂: 97 %甲基硫菌灵 (Thiophanate-methyl) 原药, 由浙江威尔达化

工有限公司提供。

其他试剂盒：ALL-DNA-FAST-Out 裂解液（生工生物）、真菌 DNA 快速抽提试剂盒（生物生工，上海）、质粒提取 SanPrep Column Plasmid mini-Preps 试剂盒（生工生物，上海）、SanPrep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒（生工生物，上海）。

仪器：PCR 扩增仪（AB 公司），凝胶成像系统（Tanon），超级恒温水槽（上海森信实验仪器有限公司），恒温加热器。

2.1.2 引物设计

使用在线引物设计软件 Primer Explore V5 (<http://primerexplorer.jp/e/v5>)，以灰葡萄孢菌对苯并咪唑类杀菌剂抗性菌株 CI-3 的 β -tubulin 基因（GeneBank: FQ790278.1）含有 198 位点突变的序列为模板，设计引物（图 3.1），并在 198 位引入错配碱基，对设计出的 6 套引物（表 3.1）。引物由上海生工生物公司合成，用 dd H₂O 溶解后分装，4 °C 保存备用。

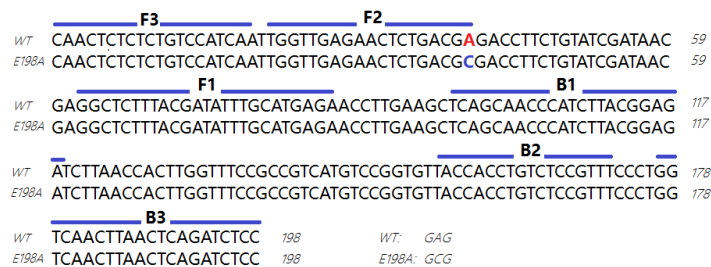


图 2.1 用于检测 *Botrytis cinerea* E198A 突变体基因型的 β -tubulin 基因中的 LAMP 引物的位置。蓝色粗线表示引物的位置

Figure 2.1 Location of LAMP primers in the β -tubulin gene of *Botrytis cinerea* used to detect the E198A mutant genotype. Bold lines indicate location of the primers

表 2.1 LAMP 引物筛选
Table 2.1 Screening LAMP primer set

引物名称 Primer name	引物组 Primer set	类型 Type	序列 Sequence (5'-3')
BC-198-F3		Forward outer	CAACTCTCTGTCCATCAA
BC-198-B3		Reverse outer	GGAGATCTGAGTTAAGTTGACC
BC-198-FIP1	S1	Forward inner	TTCATGCAAATATCGTAAAGAGCCTG GTTGAGAACTCTGACG C
BC-198-FIP2	S2	Forward inner	TTCATGCAAATATCGTAAAGAGCCTG GTTGAGAACTCTGAC CC
BC-198-FIP3	S3	Forward inner	TTCATGCAAATATCGTAAAGAGCCTG

2.1.3 基因组

DNA 提取

将菌株 TM-10 和 Cl-3 在 PDA 上纯培养 7d 后，利用真菌 DNA 快速抽提试剂盒

BC-198-FIP4	S4	Forward inner	GTTGAGAACTCTGACCCG TCTCATGCAAATATCGTAAAGAGCCTG GTTGAGAACTCTGACTC
BC-198-FIP5	S5	Forward inner	TCTCATGCAAATATCGTAAAGAGCCTG GTTGAGAACTCTGACAC
BC-198-FIP6	S6	Forward inner	TCTCATGCAAATATCGTAAAGAGCCTG GTTGAGAACTCTGAAGC
BC-198-BIP		Reverse inner	CAGCAACCCATCTTACGGAGAAAACG GAGACAGGTGGTA
BCtubF		Forward	AGGTACCATGGATGCTGTCC
BCtubR		Reverse	AAATGGCAGAGCATGTCAA

（生物生工，上海）按照说明书进行 DNA 提取。

2.1.4 引物筛选

LAMP 反应体系预设为 25 μL ，各组分的浓度预设为 Bst DNA 聚合酶（8 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ）1.0 μL 、10 $\times$ Thermo Pol 2.5 μL 、 Mg^{2+} （25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ）16 μL 、dNTP（10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ）1 μL 、FIP/BIP（20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ）各 0.5 μL 、F3/B3（10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ）各 0.5 μL 、甜菜碱（8 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ）0.8 μL 、HNB（3.75 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ）1 μL 、DNA 模板 0.5 μL ，无菌超纯水补充至 25 μL 。LAMP 反应参数设为 65 $^{\circ}\text{C}$ ，60 min。LAMP 反应结束后，可以通过颜色变化和电泳图谱判定是否为阳性扩增。如果 E198A 灰葡萄孢菌样品 LAMP 扩增产物显示天蓝色，电泳图谱为梯状条带，待测样品为阳性。敏感型菌株样品 LAMP 扩增产物显示紫色，电泳图谱无条带扩增，判定待测样品为阴性，从而筛选出特异性引物进行下一步实验。每个处理三次重复，实验重复三次，下同。

2.1.5 LAMP 反应体系的优化

LAMP 各反应组分优化，Bst DNA 聚合酶浓度依次设为 0.08/0.16/0.24/0.32 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ； Mg^{2+} 浓度依次设为 1.0/2.0/3.0/4.0/5.0/6.0/7.0/8.0 mM；dNTP 浓度依次设为 0.4/0.6/0.8/1.0/1.2 mM；FIP/BIP 浓度依次设为 0.4/0.8/1.2/1.6/2.0 μM ；F3/B3 浓度依次设为 0.1/0.2/0.3/0.4/0.5 μM ；0.2/0.4/0.6/0.8/1.0/1.2 mM；甜菜碱浓度依次设为 0.2/0.4/0.6/0.8/1.0/1.2 mM。

2.1.6 LAMP 反应条件的优化

为了确定最佳反应温度和反应时间，首先将反应管在 59 $^{\circ}\text{C}$ ，60 $^{\circ}\text{C}$ ，61 $^{\circ}\text{C}$ ，62 $^{\circ}\text{C}$ ，63 $^{\circ}\text{C}$ ，64 $^{\circ}\text{C}$ ，65 $^{\circ}\text{C}$ 和 66 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温条件下温育 60 min。然后在最佳温度下进行分别温育 15 min，30 min，45 min，60 min，90 min，105 min 和 120 min，以确定最短反应时间，反应时间的增长会增加假阳性风险的产生。随后，为了终止反应，将所有反应管在 80 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min。如上所述，LAMP 反应结果基于 HNB 的变色情况判定，并用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2.1.7 LAMP 灵敏度和常规 PCR 比较

为了比较 LAMP 和常规 PCR 之间的灵敏度,使用引物 BCtubF 和 BCtubR(表 2.1),以 CL-3 菌株 DNA 为模板,通过 PCR 扩增 β -tubulin 基因上包含第 198 位约 740 bp 的 DNA 片段。扩增程序为 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 40s, 30 个循环,然后 72 °C 延伸 5 min。PCR 扩增纯化产物在 16 °C 直接克隆到 pMD19 T-Simple 载体中,转化到 Trans1-5 α 感受态细胞中(全式金生物,北京),37 °C 孵育过夜,将阳性克隆转移至含有氨苄青霉素的 LB 液体培养基置于摇床中,37 °C,200 rpm 孵育 12 h,用 San Prep Column Plasmid mini-Preps Kit 试剂盒(生工生物,上海),依据说明书的指示,从培养物中提取质粒 pMD740,将 pMD740 作为模板。已知质粒和插入片段的分子量,可以按照如下公式计算拷贝数^[122]。

$$\text{copies} / \text{mL} = 6.02 \times 10^{23} \times \text{浓度}(\text{g} / \text{mL}) / (\text{DNA 长度} \times 660) \quad (2.1)$$

可以计算出加入 LAMP 和 PCR 反应中的确切分子数量,然后将重组质粒连续稀释制备成含有 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^0$ 拷贝作为模板,将模板用于 LAMP 测定和常规 PCR,在如上所述的最佳反应组分和反应条件下用最佳的 LAMP 引物进行 LAMP 检测,常规 PCR 通过上述引物 BCtubF 和 BCtubR 扩增。

2.1.8 LAMP 特异性准确度测试

为了评估 LAMP 的特异性和准确性,通过进行野生型菌株的 DNA, E198A 突变体(n=6)和其他多菌灵抗性突变体作为 DNA 模板来验证本实验中 E198A LAMP 的特异性和准确度,根据前面部分所述的方法进行和评估 LAMP 检测。

2.1.9 LAMP 对田间样品的检测

2.1.9.1 田间草莓灰霉病样品核酸的提取

对浙江省嘉兴市嘉善县、嘉兴市桐乡市、杭州市建德市、杭州市下沙区、杭州市临安区和绍兴市诸暨市 6 地设施草莓上,采集到的 78 个患灰霉病的病果,直接进行 LAMP 检测。对于每个草莓灰霉病果实分别编号,从草莓表面霉层刮取约 2 mg 菌丝或孢子至少量表皮组织,加入到含有 50 μ L All-DNA-Fast-Out(生工生物,上海)的 0.2 mL PCR 管中,在 80 °C 孵育 5-10 min 后,将上清液直接用做 LAMP 检测的模板。

2.1.9.2 LAMP 检测

用已经筛选出的最佳 LAMP 引物、最佳反应组分和反应条件所建立的 LAMP 体系,对前处理获得的田间样品模板进行 LAMP 检测。

2.1.9.3 区分剂量法

同时,将各试验的草莓果实分别装入采样袋,带回实验室中,对田间 LAMP 检测结果进行验证。按照之前报道的方法,对这 78 个草莓灰霉病样品进行单孢分离。用无菌水洗下草莓病果表面孢子,制成孢子悬浮液,将孢子悬浮液涂布到

2%水琼脂上（琼脂 20 g，蒸馏水定容到 1000 mL 灭菌后保存备用），并在 22℃ 温育 6 h，在显微镜上观察，将含有一个孢子的琼脂块从水琼脂中取出并置于含 0.5 μg/mL 链霉素的马铃薯葡萄糖琼脂培养基（PDA：200 g 马铃薯，20 g 葡萄糖，20g 琼脂，蒸馏水定容到 1000 mL，灭菌后保存备用）上，25℃ 培养 3 d，继代纯化 3 次后保存于 PDA 斜面上备用^[123]。使用传统的区分剂量法评估灰霉病菌对甲基硫菌灵的敏感性。每个菌株活化培养 3 d 后，在培养皿同一生长圆周上打取生长一致的菌饼（5 mm），转移到含有 0、5、20 和 100 μg/mL 的甲基硫菌灵的 PDA 培养基上，在 22℃ 黑暗条件下培养 3 d 后，观测菌丝生长情况。所测菌株不同表型可定义为（S）：最低抑菌浓度 MIC < 5 μg/mL；（LR）：5 μg/mL < MIC < 20 μg/mL；（MR）：20 μg/mL < MIC < 100 μg/mL；（HR）：MIC > 100 μg/mL^[118]。

2.1.9.4 不同表现型灰霉病菌 *β-tubulin* 基因的序列比较

对不同表现型的灰霉病菌培养 7 d 后提取 DNA，使用引物 BCtubF 和 BCtubR 进行 PCR 扩增，扩增出包含 *β-tubulin* 基因的第 198 和第 200 个密码子的 DNA 片段。反应体系为 50 μL：25 μL 2×PCR Master，0.4 μM 引物 BC-cytb-F 和 BC-cytb-R，1 μL DNA 模板，dd H₂O 补足 50 μL，PCR 程序是 95℃ 5 min；95℃ 30 s，55℃ 30 s 和 72℃ 40 s，35 个循环，接着 72℃ 延伸 5 min。通过凝胶电泳分析 PCR 产物，扩增产物经过割胶纯化回收后（SanPrep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒，生工生物，上海）送上海生工生物测序，测序结果经过 Blast 比对后，用 Seqbuilder 软件进行分析。

批注 [A1]: 全文统一

2.2 结果与分析

2.2.1 LAMP 特异性引物

从 6 套 LAMP 引物中筛选到 2 套 LAMP 引物（S2 和 S5），使敏感菌株不能扩增出产物，颜色显示为紫色，琼脂糖凝胶电泳图谱无梯状条带（图 2.2 a），而抗药性 E198A 菌株有特异性扩增，LAMP 产物显示为天蓝色，琼脂糖凝胶电泳图谱呈梯状条带（图 2.2 b）。随机挑选引物 S2 进行下一步实验。

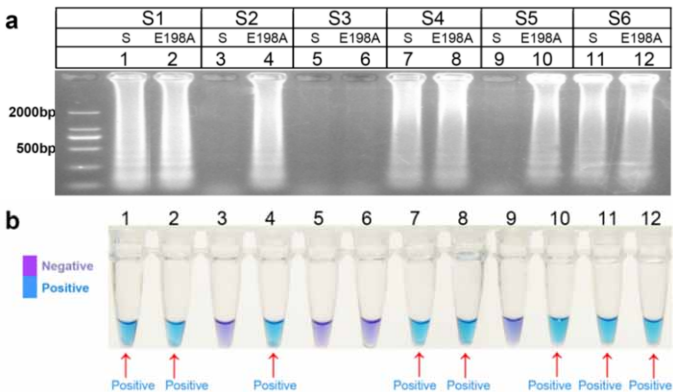


图 2.2 LAMP 特异性引物筛选. S 反应管中含有对多菌灵敏感的灰霉 DNA 样品, 即管 1, 3, 5, 7, 9, 11; E198A 反应管中含有 E198A 基因型灰霉菌株 DNA 样品, 即管 2, 4, 6, 8, 10, 12. a: LAMP 反应产物凝胶电泳图. b: LAMP 反应产物可视化 HNB 显色图; 红色箭头代表阳性反应

Figure 2.2 Determining six sets (S1–S6) of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) primers. Label 1, 3, 5, 7, 9, 11: the template DNA was extracted from the carbendazim sensitive strain (S). Label 2, 4, 6, 8, 10, 12: the template DNA was extracted from the isolates of *Botrytis cinerea* with the E198A mutation (E198A). a: LAMP product detected on 1% agarose gel electrophoresis. Lane M represented the DL2000 DNA marker. b: HNB-based visual changes in colors. The positive samples were pointed out by red arrows

2.2.2 Bst DNA 聚合酶量的优化

为了筛选出最低但能实现 LAMP 反应的聚合酶浓度, 从而筛选出以较低检测成本就能达到快速检测目的的体系。如图 2.3 所示, Bst DNA 聚合酶在优化所用的浓度梯度下均能扩增出条带, 但在质量浓度为 $0.08 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 时, 虽能扩增出梯状条带, 但颜色变化并不显著, 当 Bst DNA 聚合酶浓度大于 $0.08 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 时, 反应管颜色变化明显, 由反应前紫色变为天蓝色。说明体系中 Bst DNA 聚合酶的最低质量浓度为 $0.16 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 即在 $25 \mu\text{L}$ LAMP 检测体系中 $0.5 \mu\text{L}$ 的 Bst DNA 聚合酶 ($8 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 是支持反应进行的最少酶量。

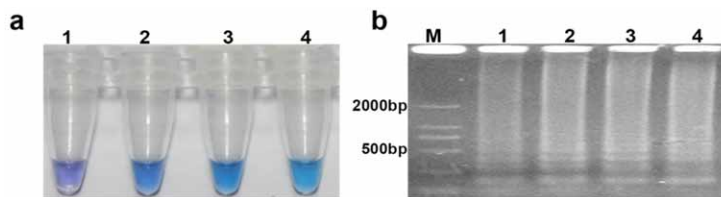


图 2.3 Bst DNA 聚合酶量的优化. a: Bst DNA 聚合酶浓度优化的 HNB 显色变化图; b: Bst DNA 聚合酶浓度优化的琼脂糖凝胶电泳图. M: DNA marker, 1. $0.08 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; 2. $0.16 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; 3. $0.24 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; 4. $0.32 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$

Figure 2.3 Optimization of Bst DNA polymerase concentration. a: Assessment based on HNB visualization of color change of the LAMP products. b: Assessment based on gel electrophoresis analysis of the LAMP products. M: DNA marker. 1. $0.08 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; 2. $0.16 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; 3. $0.24 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; 4. $0.32 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$

2.2.3 dNTPs 浓度的优化

dNTPs 浓度小于 0.8mM 时，反应管颜色变化不明显，电泳图没有典型的 LAMP 梯形条带。当 dNTPs 浓度为 1.0 mM 时，反应管颜色变化最明显，由反应前紫色变为天蓝色，扩增效率最高（图 2.4），所以 1.0 mM 是 dNTPs 参与反应的最佳浓度。

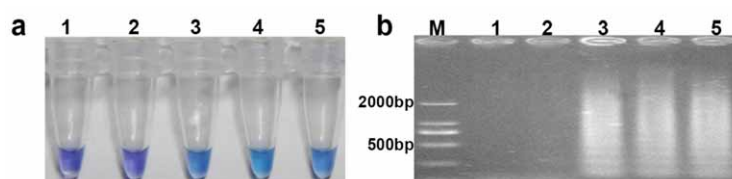


图 2.4 dNTPs 浓度的优化. a: dNTPs 浓度优化的 HNB 显色变化图; b: dNTPs 浓度优化的琼脂糖凝胶电泳图. M: DL2000 DNA marker; 1: 0.4 mM; 2: 0.6mM; 3: 0.8 mM; 4: 1.0 mM; 5: 1.2mM

Figure 2.4 Optimization of dNTPs concentration. a: Assessment based on HNB visualization of color change of the LAMP products; b: Assessment based on gel electrophoresis analysis of the LAMP products. M: DL2000 DNA marker; 1: 0.4 mM; 2: 0.6mM; 3: 0.8 mM; 4: 1.0 mM; 5: 1.2mM

2.2.4 引物浓度的优化

对反应体系中四条引物浓度进行优化，结果表明 F3/B3 的浓度对 LAMP 反应扩增没有明显影响，其浓度在 $0.1\sim0.5\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，LAMP 反应均能进行，挑选 F3/B3 浓度 $0.3\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 进行后续 LAMP 扩增（图 2.5 a b）。对于内引物，当 FIP/BIP 浓度为 $1.6\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，扩增效率最高，反应后颜色变化更明显，由反应前紫色变为天蓝色（图 2.5 c d）。

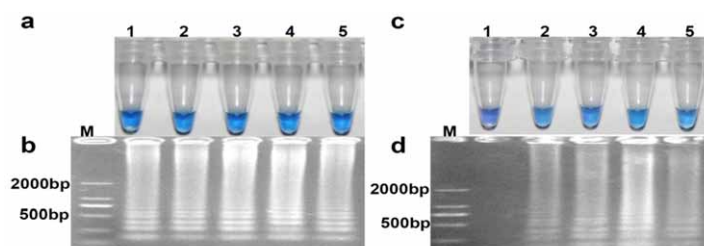


图 2.5 引物浓度的优化. a: F3/B3 浓度优化的 HNB 显色变化图; b: F3/B3 浓度优化的琼脂糖凝胶电泳图, 1: $0.1\mu\text{M}$; 2: $0.2\mu\text{M}$; 3: $0.3\mu\text{M}$; 4: $0.4\mu\text{M}$; 5: $0.5\mu\text{M}$; M:DL2000 DNA marker; c: FIP/BIP 浓度优化的 HNB 显色变化图; d: FIP/BIP 浓度优化的琼脂糖凝胶电泳图, 1: $0.4\mu\text{M}$; 2: $0.8\mu\text{M}$; 3: $1.2\mu\text{M}$; 4: $1.6\mu\text{M}$; 5: $2.0\mu\text{M}$; M:DL2000 DNA marker

Figure 2.5 Optimization of primer concentrations. a: The evaluation of F3/B3 concentrations in

accordance with HNB color changes of the LAMP reaction; b: The evaluation of F3/B3 concentrations in accordance with gel electrophoresis analysis, label 1: 0.1 μM ; 2: 0.2 μM ; 3: 0.3 μM ; 4: 0.4 μM ; 5: 0.5 μM . c: The evaluation of FIP/BIP concentrations in accordance with HNB color changes of the LAMP reaction. d: The evaluation of FIP/BIP concentrations in accordance with gel electrophoresis analysis, label 1: 0.4 μM ; 2: 0.8 μM ; 3: 1.2 μM ; 4: 1.6 μM ; 5: 2.0 μM ; Lane M represents the DL2000 DNA molecular weight markers

2.2.5 甜菜碱浓度的优化

对于甜菜碱浓度的筛选结果表明, 甜菜碱浓度小于 $0.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 反应管颜色保持紫色颜色变化不明显, 浓度大于 $0.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时基于 HNB 颜色变化明显, 扩增效率高, 所以甜菜碱 $0.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 是支持 LAMP 反应进行的最低浓度(图 2.6)。

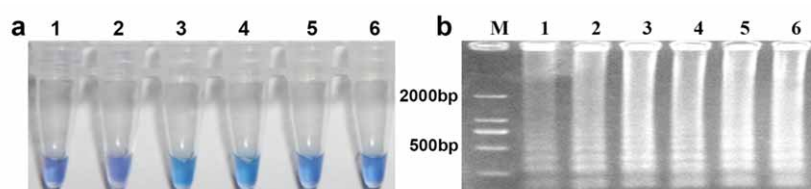


图 2.6 甜菜碱浓度的优化. a: 甜菜碱浓度优化的 HNB 显色变化图; b: 甜菜碱浓度优化的琼脂糖凝胶电泳图, M: DNA marker; 1: $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 2: $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 3: $0.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 4: $0.8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 5: $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 6: $1.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

Figure 2.6 Optimization of betaine concentrations. a: Assessment based on HNB visualization of color change of the LAMP products; b: Assessment based on gel electrophoresis analysis of the LAMP products, M:DNA marker; 1: $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 2: $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 3: $0.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 4: $0.8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 5: $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 6: $1.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

2.2.6 Mg^{2+} 浓度的优化

HNB 是 Mg^{2+} 的指示剂, LAMP 反应过程中产生的 $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ 会和 Mg^{2+} 结合产生沉淀, 溶液中的 pH 值发生改变, HNB 达到变色的目的。设置了一系列 Mg^{2+} 浓度, 结果表明, 当 Mg^{2+} 浓度小于 $3.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 扩增反应不能进行, 当浓度大于 $6.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 扩增效率降低, 高浓度会抑制反应的进行。而 Mg^{2+} 浓度为 $4.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 反应管颜色变化明显, 扩增效率高 (图 2.7)。

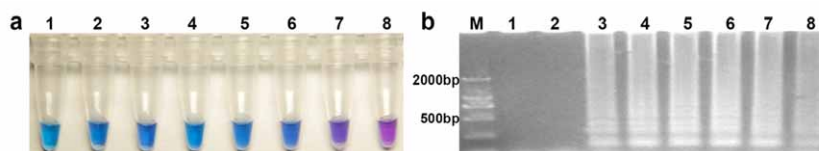


图 2.7 Mg^{2+} 浓度的优化. a: LAMP Mg^{2+} 浓度优化的 HNB 显色变化图; b: LAMP Mg^{2+} 浓度优化的琼脂糖凝胶电泳图, M: DNA marker ;1: 1.0 $mmol \cdot L^{-1}$; 2: 2.0 $mmol \cdot L^{-1}$; 3: 3.0 $mmol \cdot L^{-1}$; 4: 4.0 $mmol \cdot L^{-1}$; 5: 5.0 $mmol \cdot L^{-1}$; 6: 6.0 $mmol \cdot L^{-1}$; 7: 7.0 $mmol \cdot L^{-1}$; 8: 8.0 $mmol \cdot L^{-1}$

Figure 2.7 Optimization of Mg^{2+} concentrations. a: Assessment based on HNB visualization of color change of the LAMP products; b: Assessment based on gelelectrophoresis analysis of the LAMP products; M. DNA marker ;1: 1.0 $mmol \cdot L^{-1}$; 2: 2.0 $mmol \cdot L^{-1}$; 3: 3.0 $mmol \cdot L^{-1}$; 4: 4.0 $mmol \cdot L^{-1}$; 5: 5.0 $mmol \cdot L^{-1}$; 6: 6.0 $mmol \cdot L^{-1}$; 7: 7.0 $mmol \cdot L^{-1}$; 8: 8.0 $mmol \cdot L^{-1}$

2.2.7 最终体系确定

经过上述 LAMP 体系的优化，最终优化筛选出适合检测抗苯并咪唑类杀菌剂 E198A 基因型草莓灰霉病菌的 LAMP 体系组分由表 2.2 所示。

表 2.2 LAMP 体系
Table 2.2 LAMP component

组分（浓度） Component (concentration)	终浓度 Final concentration	体积 Volume (μL) per 25 μL reaction
Bst DNA (8 U· μL^{-1})	0.16 U· μL^{-1}	0.5
10×Thermo Pol		2.5
Mg^{2+} (25mM)	4 mM	4
dNTP(10mM)	1 mM	2.5
FIP/BIP(20 μM)	1.6 μM	2
F3/B3(10 μM)	0.3 μM	0.75
betine(5M)	0.6 M	3
HNB (3.75mM)	150 μM	1
Sample DNA	100 ng· μL^{-1}	1
ddH ₂ O		5.25

2.2.8 最佳 LAMP 反应条件

反应条件的优化在上述优化后的反应体系下进行，对于所设置的一系列温度梯度，结果表明，反应能在 62℃至 65℃的条件下进行（图 2.8），在 64℃温度条件下，反应扩增效率高，颜色变化明显，挑选 64℃为 LAMP 反应温度。在 64℃温度条件下，设置一系列反应时间，当反应进行 60 min 时即可达到明显的反应效果，反应管颜色变化明显，扩增条带清晰（图 2.9）

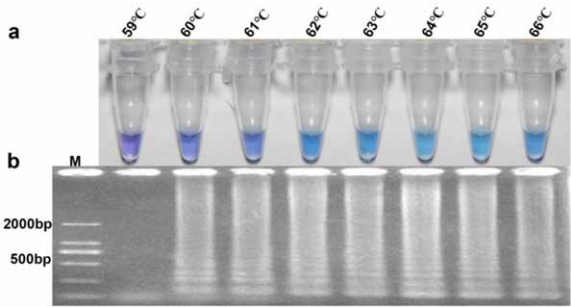


图 2.9 灰霉病菌 E198A 突变型 LAMP 检测反应温度的优化. a: LAMP 反应温度优化的 HNB 显色变化图; b: LAMP 反应温度优化的凝胶电泳图, M: DL2000 DNA marker

Figure 2.9 Optimization reaction temperature of the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of the E198A mutant genotype of *Botrytis cinerea*. a: HNB-based visual changes in colors from violet to sky blue. b: LAMP product detected on 1% agarose gel electrophoresis, Lane M represented the DL2000 DNA marker

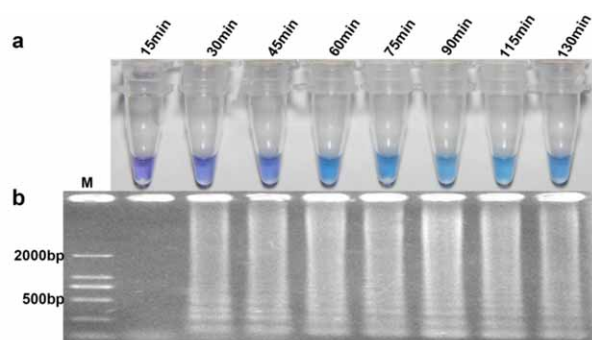


图 2.10 灰霉病菌 E198A 突变型 LAMP 检测反应时间的优化. a: LAMP 反应时间优化的 HNB 显色变化图; b: LAMP 反应时间优化的凝胶电泳图, M: DL2000 DNA marker

Figure 2.10 Optimization reaction time of the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of the E198A mutant genotype of *Botrytis cinerea*. a: HNB color changes in the LAMP reaction from violet to blue; b: LAMP product detected on 1% agarose gel electrophoresis, Lane M represented the DL2000 DNA marker

2.2.9 LAMP 检测限

以重组质粒 pMD740 为模板，10 倍梯度稀释用于 LAMP 检测限的测定并与常规 PCR 进行比较。基于 HNB 颜色变化和凝胶电泳分析表明 LAMP 检测的检测限为 100 拷贝（图 2.11 a b）。然而，凝胶电泳显示 PCR 的结果可以检测到 1000 拷贝（图 2.11 c）。结果表明，与常规 PCR 相比，LAMP 测定的灵敏度高 10 倍。

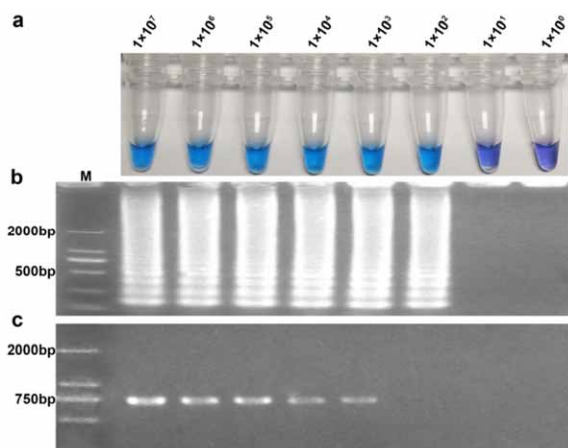


图 2.11 检测灰霉病菌 E198A 基因型 LAMP 灵敏度。重组质粒 pMD740 为模板其拷贝数与指定的数目相同, pMD740 含有具有灰葡萄孢 E198A 突变的 740bpDNA 片段, M: DL2000 DNA maker, 在(a), (b)和(c)中 pMD740 模板量分别为 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 , 1×10^1 , 1×10^0 个拷贝

Figure 2.11 Sensitivity of LAMP to detect the E198A genotype of *Botrytis cinerea* compared with conventional PCR. The template contained recombinant plasmid whose copies is as same as the indicated number, pMD740, which contained the 740bp DNA fragment with the *B. cinerea* E198A mutation, Lane M represented the DL2000 DNA marker. A serial dilutions of DNA templates containing 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 , 1×10^1 , 1×10^0 copies in (a), (b) and (c)

2.2.10 LAMP 检测的准确度

LAMP 检测仪对 6 个已知灰霉病菌 E198A 突变体呈现阳性反应, 对于其他突变类型或野生型菌株样品则没有观察到阳性反应(图 2.12)。表明建立的 E198A LAMP 测定具有良好的特异性, 准确性和稳定性。

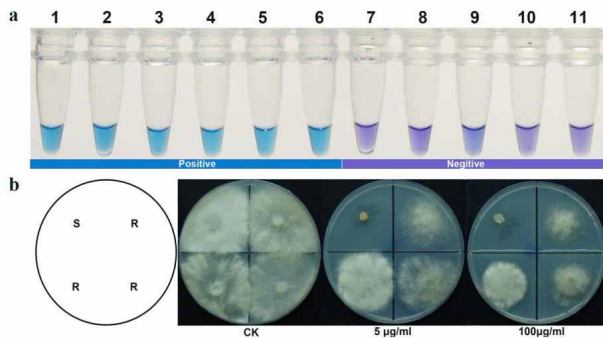


图 2.12 LAMP 测定的特异性和准确性. a: 基于 HNB 颜色变化检测 LAMP 产物图, 1-6: E198A 基因型灰葡萄孢 DNA 模板, 7-11: 分别是 E198V, E198K, F200Y, 野生型灰葡萄孢 DNA 模板和 ddH₂O; b: 区分剂量法实验结果

Figure 2.12 Specificity and accuracy of the developed LAMP assay to detect different isolates of *Botrytis cinerea*. a: HNB color changes in the LAMP reaction, Label 1 to 6: E198A, Label 7 to 11: E198V, E198K, F200Y, wild-type, ddH₂O; b: Detection of field samples by distinguishing dosage Method

2.2.11 LAMP 在 1.5h 内检测田间草莓灰霉病的抗药性

使用 LAMP 测定和区分剂量法方法分析从六个不同地点收集的 78 个灰霉病草莓田间样品，用 All-DNA-Fast-Out 处理后的粗提液（含 DNA 浓度 100~150 ng/μL）直接用于 LAMP 测定，在最优反应体系下，64 °C 下反应 1 h。E198A-LAMP 检测结果表明，共检测到 45 个阳性样品。区分剂量法和 PCR 测序的结果显示，78 个样品含有 53 个甲基硫菌灵高抗菌株，其中包括 45 株 E198A 和 8 株 E198V 基因型灰霉病菌，抗性频率 68%；25 个敏感菌株，频率为 32%（附表 1，附图 1）。结果表明，与区分剂量法相比，本研究中 LAMP 检测可以检测出所有 E198A 基因型灰霉病菌样品，且具有 100% 准确度（表 2.3）。总之，本研究中建立的 LAMP 检测可以特异性地检测不同地点采集到的灰霉病菌 E198A 基因型突变体。

表 2.3 检测不同地区草莓灰霉病菌样品
Table 2.3 Detecting *Botrytis cinerea* from different geographical origins

采集地点 Origin	样品数量 Number of samples	LAMP	区分剂量法	198 位不同突变类型数量 Number of different mutation genotypes			
		阳性	阳性*	E198A	E198V	E198K	F200Y
		Positive	Positive*				
嘉兴市嘉善县	14	7	7	7	0	0	0
嘉兴市桐乡市	12	8	11	8	3	0	0
杭州市建德市	11	6	6	6	0	0	0
杭州市下沙区	10	5	7	5	2	0	0
杭州市临安区	21	10	14	10	4	0	0
绍兴市诸暨市	10	9	9	9	0	0	0
总计	78	45	53	45	8	0	0

*区分剂量阳性：MIC > 100 μg/mL

2.3 讨论

作为一种高抗药性风险病原体，在田间连续暴露后，灰霉病菌对杀真菌剂的抗性可迅速出现，一旦抗性出现，防治效率急剧降低^[124]。

Zhang 等人研究^[118]表明，在浙江和江苏省的草莓和其他温室蔬菜病害防治中，灰霉病菌对多菌灵和甲基硫菌灵为代表的苯并咪唑类杀菌剂抗性产生严重；在其所监测年份期间，抗药性频率逐步提高，分别为 62.5%，71.7%，77.5%和 80.9%；检测到温室果蔬上的灰霉病菌对苯并咪唑和乙霉威的双重抗性的快速发展；同时检测到三种抗性表型，Ben R1，Ben R2 和一种新抗性表型 Ben R3。本研究中，浙江省不同产区的草莓灰霉病菌群体对甲基硫菌灵产生高水平抗性频率已高达 68%，其中大部分为 Ben R1 型菌株，其 *β-tubulin* 基因上 198 位密码子由

GAG 突变为 GCG (E198A)，对苯并咪唑类高抗同时对乙霉威敏感；并且检测到少量 Ben R3 型菌株，表现为 198 位密码子由 GAG 突变为 GTG (E198V)，对乙霉威敏感，这与 Zhang 等人研究结果一致；但在本章研究中没有检测到 Ben R2 型 (TTC→TAC, F200Y) 灰霉菌株，即对乙霉威也表现抗性的双重抗药性灰霉菌株没有被检测到。本研究建议苯并咪唑类杀菌剂在草莓病害的防治上应减少使用，且谨慎使用多菌灵·乙霉威混剂。

在病原菌抗药性检测中，区分剂量法是检测病原真菌对杀菌剂抗性的常用方法^[123, 125]，但是它不适用于快速检测及田间应用。基于分子检测的方法如 Real-time PCR^[116]，不仅需要 4 到 5 h 还依赖昂贵的设备和熟练操作的技术人员，限制了其在各个领域的应用。在本章研究中，通过 LAMP 来检测灰霉病菌 E198A 突变体。对于样品预处理，在 10 min 内用 All-DNA-Fast-Out 提取 DNA，消除了传统 DNA 提取过程中的离心，提取等操作步骤，节省了样品预处理的时间，减少样品间的污染，达到快速检测的目的。本章研究中，该 LAMP 测定可以在 1.5 h 内完成，且只需要恒温加热器，因此本研究提供了一种可以在田间植物病原体中快速检测其抗药性的方法，本研究是首次应用 LAMP 检测灰霉病菌抗药性的报。

许多研究发现灰霉病菌 E198A 突变类型是对 BEN 高抗的优势亚群^[118]，本章结果显示在耐药菌株中，有 84.9% 的具有单点突变 E198A (GAG→GCG)。正如之前 Elad 研究^[18]所表明的，灰霉 E198A 突变体在抗 BEN 的亚群中占主导地位 (94.7%)，这可能解释了 E198A 的强竞争能力。因此，监测 E198A 亚群可以为抗性的发展提供足够的数据。与常规 PCR 相比，本研究中 LAMP 检测灵敏度提高了 10 倍左右。此外，该 LAMP 检测可以成功地将灰霉病菌田间 E198A 突变体与敏感性菌株和其他突变体 (E198V, E198K 和 F200Y) 区分开来，并具有 100% 的准确性。

综上所述，本章研究建立了一个快速直观的 LAMP 检测方法，可用于现场检测灰霉病菌 E198A 突变，包括核酸提取过程，可在 1.5 h 内可以完成抗药性检测。该检测可用于监测田间病原菌群体抗药性的发展，为病害管理控制提供即时信息。本研究推测，将来 LAMP 可更广泛应用于植物病原菌的检测，包括对杀菌剂的敏感性监测。

3 快速检测和评估草莓灰霉病菌对 QoI 类杀菌剂的抗性发展

甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂 (QoIs) 是一种来源于具有杀菌活性的天然抗生素 (strobilurinA) 的呼吸抑制剂, 且具有广谱性。QoI 类杀菌剂能与真菌细胞色素 b 结合, 阻止了细胞色素 b 和 c1 之间的电子转移。一般来说, 真菌 *cytb* 基因 143 位密码子上的点突变是导致植物病原真菌对 QoIs 产生抗性的主要原因^[43-44], 另外, *B. cinerea* 菌株 *cytb* 基因上含有 Bcbi-143 / 144 内含子时极不容易发生突变, 对 QoIs 产生抗性的风险水平非常低^[45]。

如前几章所述, 传统的检测或监测杀真菌剂耐药性的方法是区分剂量及最小抑制浓度法 (MIC), 会伴随着较长的检测周期^[118]。为了实现快速检测, 环介导等温扩增 (LAMP) 是目前病原体检测的必要手段之一, 它是特异性高且高效快速适用于现场检测^[108]。在本研究中, 建立了用于检测灰霉病菌对 QoI 杀真菌剂抗性群体的 LAMP 体系, 以及能检测含有 BCbi143 / 144 内含子的低抗风险的灰霉病菌 LAMP 测定, 以达到评估和监测灰霉病菌种群对 QoIs 抗性及其抗性风险水平发展的目的。

3.1 材料方法

3.1.1 供试菌株及试剂

构建 LAMP 体系所用菌株: 菌株 ANB13-07 的 *cytb* 基因在第 143 位和第 144 位密码子之间插入了 1205 bp 的 Bcbi-143/144 内含子, 对 QoI 类杀菌剂敏感。菌株 TMB15-06 的 *cytb* 基因第 143 位后无 Bcbi-143/144 内含子存在, 且 143 位无点突变发生, 对 QoI 类杀菌剂敏感。LAB12-06 的 *cytb* 基因第 143 位后不含内含子, 但 143 位密码子发生点突变即 G143A (GGT→GCT), 对 QoI 类杀菌剂高度耐药。田间草莓灰霉病样品: 如第 2 章第 2.1.1 节所述。

构建 LAMP 体系所需试剂和仪器如第 2 章第 2.1.1 节所述。

供试药剂: 96 % 嘧菌酯 (Azoxystrobin) 原药, 由江西正邦生物化工有限公司提供。

3.1.2 构建 LAMP 体系中模板 DNA 的提取

从 PDA 上收集纯培养的灰霉菌丝, 用接种针挑取菌丝 (约 2 mg) 放至含有 50 μL All-DNA-Fast-out (生工生物, 上海) 的 0.2 mL 微量离心管中, 在水浴锅中 80 °C 加热 5 min。将裂解的上清液作为 DNA 模板以开发 LAMP 检测。通过分光光度计测定提取的模板浓度, 并用无核酸水稀释。

3.1.3 LAMP 引物的设计与筛选

开发了两套 LAMP 检测技术。首先用于检测对 QoI 类杀真菌剂具有高度抗性的灰霉病菌 G143A 突变体的 LAMP 称为 G143A-LAMP, 利用 Primer explorer

V5 在线设计软件，基于 *cytb* 基因第 143 位密码子（G143A）的点突变设计和错配出 8 套 G143A-LAMP 引物，为了能将 G143A 表型菌株与敏感菌株区分开，在 FIP 的 5'端引入错配碱基，基于特异性和敏感性筛选错配的 LAMP 引物，以筛选出一组最佳引物。此外，为了检测灰霉病菌中 BCbi143 / 144 内含子的存在，根据内含子 1205 bp DNA 序列设计另一组 LAMP 引物用于特异性检测内含子，称为 BCbi143 / 144-LAMP。使用的 LAMP 引物序列如图 3.1 和表 3.1 所示。

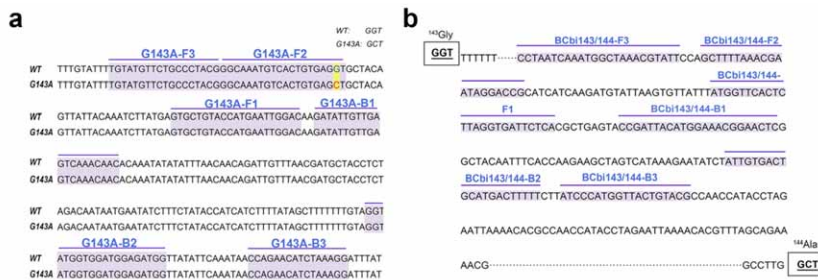


图 3.1 灰霉病菌细胞色素 b 基因 LAMP 引物的位置. a: 用于检测 G143A 突变体基因型的 LAMP 引物; b: 用于检测 *cytb* 基因的 BCbi143/144 内含子的 LAMP 引物. 蓝色粗线和阴影表示引物位置

Figure 4.1 Location of LAMP primers in *cytochrome b* gene of *Botrytis cinerea*. a: LAMP primers used to detect G143A mutant genotype; b: LAMP primers used to detect BCbi143/144 intron of *cytb* gene. Bold lines and shadows indicate primer location

表 3.1 LAMP 引物筛选
Table 3.1 Screening LAMP primer set

引物名称 Primer name	引物组 Primer set	类型 Type	序列 Sequence (5'-3')
G143A-F3		Forward outer	TGTATGTTCTGCCCTACG
G143A-B3		Reverse outer	CCTTTAGATGTTCTGG
G143A-FIP1	S1	Forward inner	GTCCAATTCATGGTACAGCACGGCAAA TGTCACGTGAGCT
G143A-FIP2	S2	Forward inner	GTCCAATTCATGGTACAGCACGGCAAA TGTCACGTGATC
G143A-FIP3	S3	Forward inner	GTCCAATTCATGGTACAGCACGGCAAA TGTCACGTGACC
G143A-FIP4	S4	Forward inner	GTCCAATTCATGGTACAGCACGGCAAA TGTCACGTGAAC
G143A-FIP5	S5	Forward inner	GTCCAATTCATGGTACAGCACGGCAAA TGTCACGTGATCA
G143A-FIP6	S6	Forward inner	GTCCAATTCATGGTACAGCACGGCAAA TGTCACGTGATCC

G143A-FIP7	S7	Forward inner	GTCCAATTCATGGTACAGCACGGCAAA TGTCACGTGTTC
G143A-FIP8	S8	Forward inner	GTCCAATTCATGGTACAGCACGGCAAA TGTCACGTGGTC
G143A-BIP		Reverse inner	GATATTGTTGAGTCAAACAACCCATCT CCATCCACCATAACC
BCbi143/144-F3		Forward outer	CCTAATCAAATGGCTAAACGTATT
BCbi143/144-B3		Forward outer	CGTACAGTAACCATGGGATA
BCbi143/144-FIP	S9	Forward inner	TGAGAATCACCTAAGAGTGAACCATGC TTTTAAACGAATAGGACCG
BCbi143/144-BIP		Reverse inner	CCGATTACATGGAACGGAACCTCAAAA GTCATGCAGTCACAAT

3.1.4 LAMP 反应体系

LAMP 检测反应在 25 μL 体系中进行，体系中各组参照第 2 章第 2.2.7 节、表 2.2 所述：8U Bst DNA 聚合酶，2.5 μL 10 $\times$ ThermoPol 缓冲液，1 mM dNTPs，5 mM Mg^{2+} ，1.6 μM FIP 和 BIP，0.3 μM F3 和 B3，0.6 M 甜菜碱，150 μM 羟基萘酚蓝(HNB, 金属离子指示剂)和 1 μL DNA 样品(DNA 通过 All-DNA-Fast-Out 快速提取，浓度为 100 ng/ μL)，用无核酸的水补足至 25 μL 。在 G143A-LAMP 测定中，将从 G143A 突变型基因型(LAB12-06)提取的 DNA 样品用作阳性样品，选择 143 位无突变的 TMB15-06 为阴性对照，无核酸水为用作空白对照。对于 BCbi143 / 144-LAMP 测定，使用菌株 ANB13-07 作为阳性样品，并使用 TMB 15-06 作为阴性对照。两个 LAMP 反应均在 61 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min，接着 80 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min。反应结果通过反应后 HNB 的可视化颜色变化(从紫色到天蓝色)进行判断，并通过 1 %琼脂糖凝胶电泳进一步证实。每个处理重复至少三次，实验重复三次，下同。

3.1.5 LAMP 反应条件的确定

LAMP 反应完成后，在日光灯下用肉眼观察反应混合物中 HNB 的颜色变化。对于阳性结果，观察到具有 HNB 的天蓝色，阴性或空白处理保持紫色不变。可通过 1 %琼脂糖凝胶电泳进一步测定反应产物(5 μL)，阳性结果显示典型的 LAMP 梯状条带，阴性反应则缺少条带。为了确定最佳反应运行条件，设定一系列恒温梯度，分别为：59.0 $^{\circ}\text{C}$ ，60.0 $^{\circ}\text{C}$ ，61.0 $^{\circ}\text{C}$ ，62.0 $^{\circ}\text{C}$ ，63.0 $^{\circ}\text{C}$ ，64.0 $^{\circ}\text{C}$ ，65.0 $^{\circ}\text{C}$ ，66.0 $^{\circ}\text{C}$ ，以确定最佳反应温度，随后在最佳反应温度下分别进行 15 min，30 min，40 min，50 min，60 min，70 min，80 min 和 90 min 以确定的 LAMP 检测最短反应时间。

3.1.6 LAMP 检测灵敏度

在 PDA 上纯培养的灰霉病菌，挑取表面菌丝，用 ALL-DNA-Fast-Out 提取 DNA。10 倍梯度稀释提取的 DNA，用作 LAMP 灵敏度测试的模板。DNA 模板的最终浓度分别为 $100, 100 \times 10^{-1}, 100 \times 10^{-2}, 100 \times 10^{-3}, 100 \times 10^{-4}, 100 \times 10^{-5}, 100 \times 10^{-6}$ ng/ μ L，dd H₂O 为空白对照。LAMP 检测限是观察到阳性结果的最低 DNA 浓度。观察样品的 HNB 颜色变化，并通过 1% 琼脂糖凝胶电泳进一步分析。

3.1.7 LAMP 检测的田间应用

3.1.7.1 LAMP 检测田间草莓灰霉病样品

为了评估本研究中 LAMP 检测的田间应用，对 2017 年从浙江省 6 个不同地区的温室采集到共 78 个草莓灰霉病果实进行 LAMP 测试。对于每个样品的前处理如第 2 章第 2.1.9 节所述，将获得的模板加入如上所述的两个 LAMP 测定中。检测结果与区分剂量法结果和 PCR 测序结果相比较。

3.1.7.2 灰霉病菌对噬菌酯的抗性测定

方法如第 2 章第 2.1.9.3 节中所述，采用区分剂量法对该节中单孢分离到的 78 个灰霉菌株进行噬菌酯的抗性测定。抗药性测定结果和 LAMP 相比较，验证 LAMP 的田间应用结果。

3.1.7.3 不同表现型灰霉病菌 *cytb* 基因的序列比较

采用引物 BC-*cytb*-F (TAAAGTGGTATAACCCGACGG) 和 BC-*cytb*-R (CCATCTCCATCCACCATACT) 对灰霉病菌 *cytb* 基因片段进行 PCR 扩增，k 扩增程序及结果分析方法同第 2 章第 2.1.9.3 节。

3.2 结果与分析

3.2.1 两个 LAMP 反应的目视检测

利用从 G143A 基因型灰霉菌株提取的 DNA 样品，筛选出 G143A - LAMP 错配引物 S7 (表 3.1)，能特异性检测出 G143A 突变体，根据 HNB 显色变化图 (图 3.2 a)，阳性反应从紫色变为天蓝色，G143A 突变体样品的 LAMP 产物在凝胶电泳中显示出典型的梯状图案 (图 3.2 b)。此外，BCbi143/144 内含子的阳性样品可通过 BCbi143/144-LAMP 引物组 S9 (表 1) 扩增，也基于 HNB 颜色变化 (图 3.2 c) 及凝胶电泳 (图 3.2 d) 来确定反应的结果。如预期所示，根据 HNB 颜色变化来看，所有阳性样品从紫色到天蓝色的颜色，但阴性对照颜色没有变化。

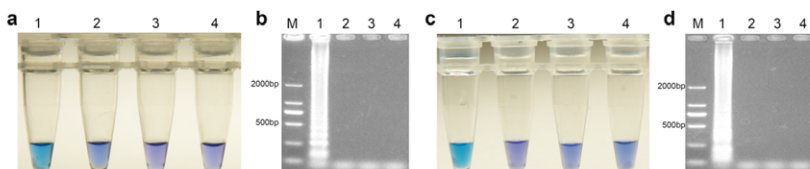


图 3.2 LAMP 测定的特异性检测. a: 基于 HNB 颜色变化的 G143A-LAMP 的特异性检测, 1: LAB12-06, 2: TMB15-06, 3: ANB13-07, 4: ddH₂O; b: 基于凝胶电泳的 G143A-LAMP 的特异性检测, 1: LAB12-06, 2: TMB15-06, 3: ANB13-07, 4: ddH₂O; c: 基于 HNB 颜色变化的 BCbi143/144-LAMP 的特异性检测, 1: ANB13-07, 2: LAB12-06, 3: TMB15-06, 4: ddH₂O
Figure 3.2 Specificity detection of LAMP assay. a: Specificity detection of G143A-LAMP on the basis of HNB color change, label 1: LAB12-06, 2: TMB15-06, 3: ANB13-07, 4: ddH₂O; b: Specificity detection of G143A-LAMP based on gel electrophoresis, label 1: LAB12-06, 2: TMB15-06, 3: ANB13-07, 4: ddH₂O; c: Specificity detection of BCbi143/144-LAMP on the basis of HNB color change, label 1: ANB13-07, 2: LAB12-06, 3: TMB15-06, 4: ddH₂O; d: Specificity detection of G143A-LAMP on the basis of gel electrophoresis, label 1: ANB13-07, 2: LAB12-06, 3: TMB15-06, 4: ddH₂O.

3.2.2 LAMP 检测最佳反应条件

通过 HNB 可视化检测和扩增产物的凝胶电泳分析, 运用最优引物进行 LAMP 扩增, 确定 LAMP 反应的最佳运行条件。结果表明, 当温度高于 61 °C 时, G143A-LAMP 反应不能进行, 反应管的颜色没有变化 (图 3.3 a)。然而, 在 60 °C 和 61 °C 反应温度下, 反应管出现明显的颜色变化, 并且在的凝胶电泳中显示出清楚的 LAMP 条带 (图 3.3 a b)。因此, 为了优化反应时间, 在 61 °C 下进行 G143A-LAMP 检测。结果表明, 在 61 °C 反应 50 min 可达到检测目的 (图 3.3 c d)。另一个用于检测灰霉菌中 BCbi143 / 144 内含子的 LAMP 检测, 在 59 °C 至 63 °C 都可以进行扩增, 结果通过颜色变化和凝胶电泳进行判断 (图 3.4 a b)。因此, 选择 61 °C 作为反应温度以同时支持两个 LAMP 检测。本研究中, LAMP 检测的最佳反应条件为 61 °C 50 min (图 3.3, 图 3.4)。

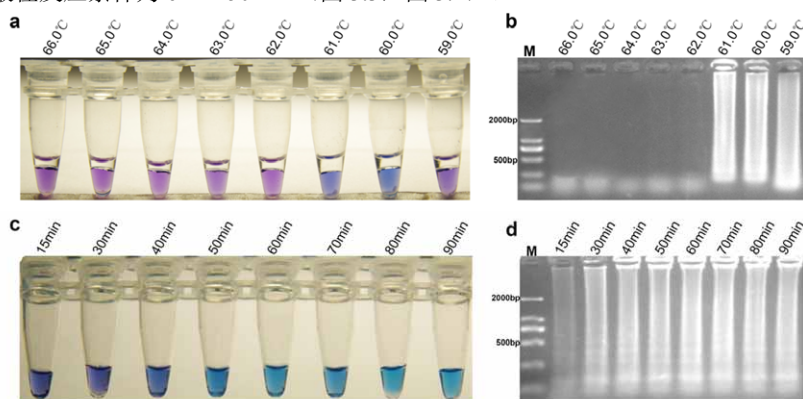


图 3.3 优化 G143A-LAMP 的反应条件. G143A-LAMP 的反应温度梯度设定为 59.0 °C, 60.0 °C, 61.0 °C, 62.0 °C, 63.0 °C, 64.0 °C, 65.0 °C, 66.0 °C. a: 基于 HNB 颜色变化优化温度; b: 基于凝胶电泳检测优化温度梯度. G143A-LAMP 的反应时间设定为 15 min, 30 min, 40 min, 50 min, 60 min, 70 min, 80 min, 90 min; c: 基于 HNB 颜色变化优化反应时间; d: 基于凝胶电泳检测优化反应时间

Figure 3.3 Optimization of reaction conditions for G143A-LAMP. Reaction temperature gradient

of the G143A-LAMP was set to 59.0°C, 60.0°C, 61.0°C, 62.0°C, 63.0°C, 64.0°C, 65.0°C, 66.0°C. a: Optimization of temperature on the basis of HNB color change; b: Optimization of temperature gradient on the basis of gel electrophoresis detection. Reaction time of G143A-LAMP was set to 15 min, 30 min, 40 min, 50 min, 60 min, 70 min, 80 min and 90 min. c: Optimization of reaction time on the basis of HNB color change; d: Optimization of reaction time on the basis of gel electrophoresis detection

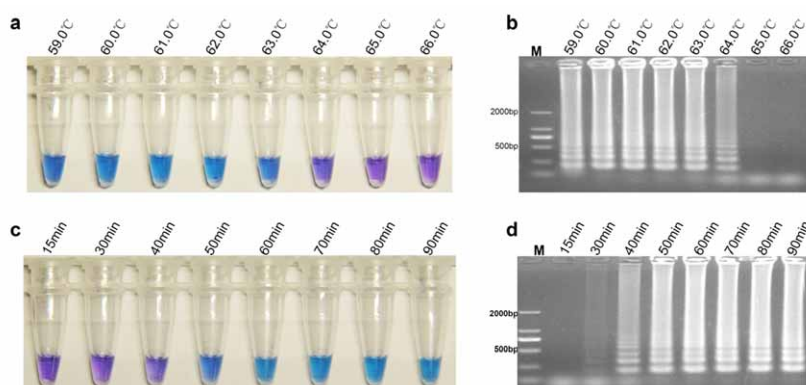


图 3.4 BCbi143/144-LAMP 反应条件的优化. BCbi143/144-LAMP 的反应温度梯度设定为 66.0°C, 65.0°C, 64.0°C, 63.0°C, 62.0°C, 61.0°C, 60.0°C, 59.0°C. a: 根据 HNB 颜色变化优化温度梯度. b: 基于凝胶电泳检测优化温度. BCbi143/144-LAMP 反应时间分别为 15 min, 30 min, 40 min, 50 min, 60 min, 70 min, 80 min, 90 min; c: 基于 HNB 颜色变化优化反应时间; d: 基于凝胶电泳检测优化反应时间

Figure 3.4 Optimization of reaction conditions for BCbi143 / 144-LAMP. Reaction temperature gradient of BCbi143 / 144-LAMP were set to 66.0°C, 65.0°C, 64.0°C, 63.0°C, 62.0°C, 61.0°C, 60.0°C, 59.0°C. a: Optimization of temperature gradient on the basis of HNB color change; b: Optimization of temperature on the basis of gel electrophoresis detection. Reaction times of BCbi143/144-LAMP were set to 15 min, 30 min, 40 min, 50 min, 60 min, 70 min, 80 min, 90 min. c: Optimization of reaction time on the basis of HNB color change; d: Optimization of reaction time on the basis of gel electrophoresis detection

3.2.3 确定 LAMP 最低检测限

对于 LAMP 灵敏度试验, 将 10 倍稀释的 DNA 模板 (ALL-DNA-Fast-Out 提取) 用作 LAMP 灵敏度测试. 根据管中 HNB 的可见颜色变化 (图 3.5 a c) 和凝胶电泳 (图 3.5 b d) 的结果表明, G143A-LAMP 检测和 BCbi143/144-LAMP 检测的检测限为 100×10^{-4} ng/ μ L。

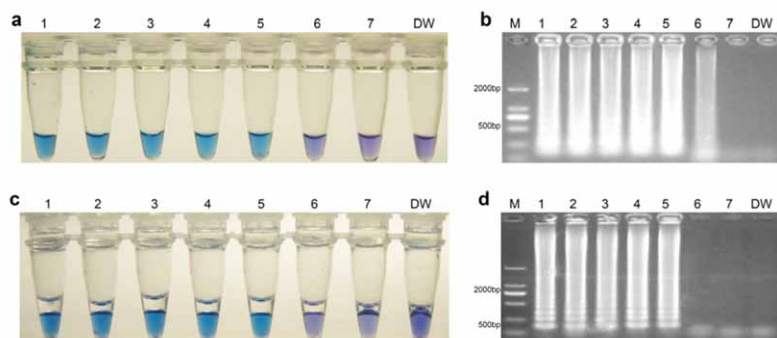


图 3.5 G143A-LAMP 和 BCbi143/144-LAMP 的灵敏度试验. 反应管 1-7 为梯度稀释的 DNA 模板, DNA 浓度分别为 100 , 100×10^{-1} , 100×10^{-2} , 100×10^{-3} , 100×10^{-4} , 100×10^{-5} , $100 \times 10^{-6} \text{ ng/}\mu\text{l}$, DW 为 dd H₂O 空白对照. a: 基于 HNB 颜色变化的 LAMP 灵敏度检测. b: 基于凝胶电泳检测的 LAMP 灵敏度检测

Figure 3.5 Sensitivity test of G143A-LAMP and BCbi143/144-LAMP. Reaction tubes 1-7 were 10-fold dilutions of the cleavage products, with DNA concentrations of 100 , 100×10^{-1} , 100×10^{-2} , 100×10^{-3} , 100×10^{-4} , 100×10^{-5} , $100 \times 10^{-6} \text{ ng/}\mu\text{l}$, and the tube DW was ddH₂O blank control. a: Sensitivity detection on the basis of HNB color change. b: Sensitivity detection on the basis of gel electrophoresis detection

3.2.4 在 1h 内完成田间草莓灰霉病抗药性的 LAMP 检测

从不同地点采集到的田间草莓灰霉病样品, 在 80°C 下用 All-DNA-Fast-Out 处理 10 min , 成功提取基因组 DNA, 将裂解产物的上清液作为 DNA 模板, 利用最优 LAMP 引物 S7 和 S9 分别进行两个 LAMP 检测, 反应均在 61°C 下反应 50 min 。LAMP 检测结果表明, G143A-LAMP 测定可以检测到 46 个阳性样品(图 3.6 b, 表 3.2), 区分剂量法测试结果显示, 在 78 个灰霉菌株中, 共检测到 46 株高水平抗药性菌株, 抗性菌株的频率为 59%; 敏感菌株 32 个, 频率为 41%(表 3.2, 附表 1, 附图 1)。如表 3.2 所示, PCR 测序分析表明, 所有对啞菌酯具有高度抗性的菌株, 在 *cytb* 基因中第 143 位密码子都发生了点突变 (G143A)。

通过 BCbi143 / 144-LAMP 测定检测之前的 G143A-LAMP 中呈阴性的样品, 结果显示, 在这 32 个样品中有 3 个样品显示阳性, 进一步说明, 田间 78 个灰霉病样品中, 只有 3.8% 的灰霉病菌菌株属于低抗性风险的 I 型表型 (图 3.6 d)。同时采用 PCR 扩增法检测菌株内含子, 结果与 BCbi143/144-LAMP 检测一致, 凝胶电泳见图 3.6 e。灰霉病菌有两种 *cytb* 基因: I 型 *cytb* 基因上第 143 位密码子后紧跟着 1205 bp 的内含子, 通过引物 BC-*cytb*-F 和 BC-*cytb*-R 扩增的产物为 1700 bp 左右; II 型 *cytb* 基因上第 143 位和 144 位密码子之间没有内含子的插入,

通过引物 BC-cytb-F 和 BC-cytb-R 扩增后的产物约为 500 bp（图 3.6 e）。

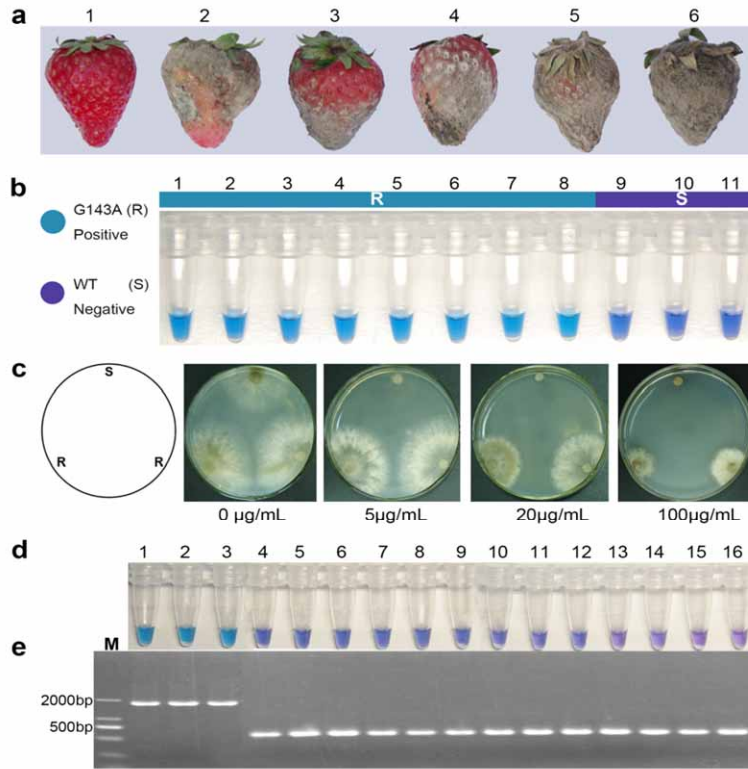


图 3.6 基于 LAMP、区分剂量法和 PCR 检测田间草莓灰霉病样品. a: 田间草莓样品, 1: 健康样品, 2-6: 草莓灰霉病样品; b: 基于 HNB 颜色变化的 G143A-LAMP 检测, 1-8: 灰霉病 G143A 突变体表型, 9-11: 敏感性菌株样品; c: 区分剂量法方法检测田间样品, S: QoI 敏感菌株, R: QoI 抗性菌株; d: Bcbi 143/144 LAMP 检测, 1-3: 具有 Bcbi-143/144 内含子的灰霉病样品, 4-16: 不含 Bcbi-143/144 内含子的灰霉病样品. e: PCR 扩增检测菌株的内含子

Figure 3.6 Detection of field strawberry samples by LAMP assays in fields and MIC testing in laboratory. a: Strawberry samples from field, label 1 healthy samples, label 2-6 strawberry fruits of gray mold in field; b: G143A-LAMP detection based on the color change of HNB, label 1-8 G143A mutant phenotypes of *Botrytis cinerea*, labels 9-11: no mutant strains of *B. cinerea*; c: Detection of field samples by distinguishing dosage method, S represents QoI-sensitive strain, R represents strain of QoI-resistance; d: Bcbi143 / 144 - LAMP reaction causing change in color, labels 1-3: *Botrytis cinerea* with Bcbi143 / 144 intron, labels 4 - 16: *B. cinerea* without Bcbi-143 / 144 intron; e: Detection of the intron of the strain using PCR amplification.

表 3.2 LAMP、区分剂量和 PCR 测序检测田间样品
Table 3.2 Field sample testing by LAMP, distinguishing dosage method and PCR.

地点 Origin	样品 数量 Number	LAMP 阳性 LAMP Positive		MIC 阳性 MIC Positive ^x	突变表型 Mutation genotypes	
		G143A	BCbi143/144		G143A	143/144 内含子
嘉兴市嘉善县	14	3	0	3	3	0
嘉兴市桐乡市	12	11	0	11	11	0
杭州市建德市	11	4	0	4	4	0
杭州市下沙区	10	7	0	7	7	0
杭州市临安区	21	12	2	12	12	2
绍兴市诸暨市	10	9	1	9	9	1
总计	78	46	3	46	46	3

^xMIC 阳性：最小抑制浓度>100 µg mL⁻¹.

3.3 讨论

LAMP 是一种用于基因扩增的创新技术,也是早期检测和鉴定疾病的简单诊断工具^[126]。LAMP 提供了一种更为简单的诊断病原菌的方法,是具有足够特异性检测 DNA 片段上单碱基差异的^[112-115]。在本章的研究中,设计和筛选了错配的引物,以检测灰霉病菌对 QoIs 的抗性,在 FIP 的 3'末端引入错配的碱基,以区分 G143A 突变体和敏感菌表型。筛选了 8 组引物,发现在 FIP 3'端的第 2、3 核苷酸的发生改变的引物 S7 (A 和 G→T 和 T) 能特异性检测到出 *B. cinerea* G143A 突变基因型。灰霉病菌群体可以分为有 2 个亚群: 不含 Bcbi-143/144 内含子,对 QoIs 类杀菌剂高抗(通常是 G143A),不含有 Bcbi-143/144 内含子,对 QoIs 敏感;当含有 Bcbi-143/144 内含子时,灰霉病菌均为对 QoIs 敏感型,且抗性发展风险很低^[127],所以检测内含子的存在与否可以评估灰霉病菌群体的抗性发展风险。本研究中结合 BCbi143 / 144 内含子的 1205 bp 序列,设计了用于内含子检测的 LAMP 引物组和体系,可用于监测和评估灰霉病菌抗性风险水平的发展。在本章研究中,HNB 作为指示剂,反应过程无需开盖,这种密封反应降低了在扩增后添加核酸染料 SYBR Green 时易产生假阳性的风险。

灰霉病菌对 QoIs 抗性的 LAMP 检测方法旨在满足现场快速检测的要求。为了使 LAMP 适用于现场诊断^[128],样品的预处理必须尽可能简单。在当前的一步法 LAMP 检测中,田间样品用 All-DNA-Fast-Out 预处理以提取 DNA,将裂解物作为 DNA 模板加入到事先准备好的 LAMP 反应混合物中,并在恒温加热器中孵育,该反应程序足够简单,能允许在没有精确设备和经验丰富的技术人员的情况下进行现场检测。与现有基于核酸的检测方法相比,本章研究中的 LAMP 测定

相对简单，并且包括 DNA 提取所需的时间，能够在短短 1 h 内产生结果。使用 All-DNA-Fast-Out 和传统 DNA 提取方法相比，提取无需离心或其他操作步骤，前处理时间短，减少了样品间的污染，以实现快速检测。

总之，本章研究建立了一个 LAMP 检测体系（包含两个 LAMP 检测），用于监测和评估草莓灰霉病菌对 QoIs 类杀菌剂的抗性发展风险：G143A-LAMP 可以检测出对 QoIs 高抗的菌株，BCbi143 / 144-LAMP 可检测出具有低水平抗性发展风险的灰霉病菌亚群。这是 LAMP 检测灰霉病菌对 QoIs 类杀菌剂抗性的首次报道。

4 草莓苗期炭疽病 LAMP 检测的建立和应用

当病原物侵入植物组织后,由于寄主或环境条件的限制,可能暂时停止生长活动,但仍保持其生命,寄主也不表现症状,当条件适宜,病原菌活性增强,大量繁殖,寄主发病,潜伏期可能持续整个生长季,这种现象即称为潜伏侵染。草莓炭疽病菌则具有典型潜伏侵染的特点,草莓可通过匍匐繁殖,一旦种苗带菌,到了适宜的条件,植株发病,造成大量损失。潜伏侵染的病原菌有很多,如炭疽菌属(*Colletotrichum*)、交链孢属(*Alternaria*)、拟茎点霉属(*Phomopsis*)和葡萄座腔菌属(*Botryosphaeria*)等^[129]

如何从植株体直接检测到病原菌存在,并确定病害种类,是病害预防管理中重要步骤。之前有报道表明,横向测流试纸(lateral-flow device, LFD)联合免疫测定在田间检测植物病原体方面已经取得成功^[130-131]。但是特异性 LFD 试纸需要联合免疫吸附,特定试剂盒的开发周期很长且价格昂贵,所以本实验中尝试利用 LFD 吸附和过滤核酸,从感病植株中直接进行 DNA 提取,接着进行 LAMP 等温扩增^[132],实现一步法 LAMP 检测草莓苗期炭疽病,同时参照 Chomczynski 报道的方法^[133],利用碱性聚乙二醇进行感病植株前处理,也实现了直接从植株上提取草莓炭疽病菌 DNA。

本章研究中,开发了一种直接从植株体中检测草莓苗期炭疽病的 LAMP 快速检测技术,能快速进行植株样品前处理,有助于早期草莓炭疽病的预防和治疗研究。

4.1 材料与方法

4.1.1 主要试剂与仪器

构建 LAMP 体系试剂和仪器如第 2 章第 2.1.1 节所述;横向测流试纸(lateral-flow devices, LFDs)购于 Forsite Diagnostics Ltd;聚乙二醇 200(PEG200)购于上海生工。

4.1.2 引物设计和筛选

引物设计方法如第 2 章第 2.1.2 节所述,利用在线引物设计软件,基于草莓炭疽病菌 β -tubulin 基因中保守序列,设计筛选出一套特异性草莓炭疽病菌 LAMP 检测的引物(表 4.1)。

表 4.1 LAMP 引物筛选
Table 4.1 Screening LAMP primer set

引物 名称	类型 Type	序列 Sequence (5'-3')
Tu-F3	Forward outer	CTCGACAGCAATGGAGTGT
Tu-B3	Reverse outer	TACTTGTGCGCGGAAGCC
Tu-FIP	Forward inner	GGAGCTCAGAGGTGCCGTTGCTGGCCACATTGGTGGTTG
Tu-BIP	Reverse inner	ACCTTATAGCCCCAGAGTGCAGGGTAGGAGCGAAGGTCA

4.1.3 建立草莓苗期炭疽病 LAMP 检测体系

以胶孢炭疽菌 ZJC15-3 菌株 DNA 为模板, LAMP 体系参照第 2 章第 2.2.7 节所述; 对于 LAMP 反应条件, 如同第 2 章第 2.1.6 节所述, 设置一系列温度梯度 59 °C~66 °C, 在最适温度下设置扩增时间 15 min~90 min, 以优化出最佳反应程序; 对于草莓炭疽病 LAMP 灵敏度测试, 10 倍梯度稀释 DNA 模板, 使 DNA 浓度为 10 ng/μL~10×10⁻⁷ ng/μL, 分别以其为模板, 进行 LAMP 和 PCR 扩增, 对比 LAMP 和 PCR 的灵敏度, PCR 扩增使用引物 Tu-F3 和 Tu-B3。每个处理重复三次, 实验重复三次, 下同。

4.1.4 LAMP 特异性测试

分别以本实验室中保存的不同刺盘孢属 (*Colletotrichum* spp.) 菌株和草莓灰霉病菌 DNA 为模板, dd H₂O 为阴性对照, 测试本实验中草莓炭疽病 LAMP 检测体系的特异性, 所用真菌包括胶孢炭疽菌 (*C. gloeosporioides*)、墨色刺盘孢菌 (*C. atramentarium*)、辣椒炭疽菌 (*C. capsici*)、平头炭疽菌 (*C. truncatum*)、灰葡萄孢 (*B. cinerea*)。真菌 DNA 提取均使用如前试剂盒提取。

4.1.5 直接提取草莓植株样品 DNA

4.1.5.1 用横向测流试纸 (lateral-flow device, LFD) 直接提取草莓植株组织 DNA

参照 Tomlinson 报道的方法^[132], 在 Extraction buffer 中裂解植物材料, 随后将含有粗提取物的缓冲液加到 LFD 的释放垫, 使其沿着装置毛细管层析到硝酸纤维素膜上 (LFD 膜)。可以将膜的一部分直接添加到 DNA 扩增反应, 例如 LAMP, 来扩增 LFD 膜上的 DNA。将患病草莓植物组织样品 (100 mg) 加入含有五个钢球 (直径 5 mm) 和 1mL Extraction buffer (Forsite Diagnostics Ltd.) 的塑料瓶中, 剧烈振荡 90 s 以破坏样品材料。这种方法导致植物组织的充分破裂以释放 DNA。从瓶中吸取缓冲液 (70 μL) 转移到 LFD 膜上。在室温下干燥 LFD 装置, 之后将 LFD 膜的一部分 (≈5×1 mm) 直接添加到 LAMP 反应混合物中作为模板, 同时以未受感染的健康组织作为对照, 根据上述同样的方法进行前处理。(简单的样品前处理后, 裂解液中混合物 DNA 浓度为 100-200 ng/μL)

4.1.5.2 碱性聚乙二醇 200 (PEG 200) 直接从植株提取 DNA/

20 mM KOH-60% PEG 提取溶液的配制: 60g PEG 200, 0.93 mL 2M KOH 和 39 mL H₂O, 使 pH 在 13.3~13.5。将 10 mg 植物样品加入 100 μ L 碱性 PEG 中室温浸泡 15 min, 或 80~100 $^{\circ}$ C 加热 10 min 以裂解组织释放 DNA^[133]。

4.1.6 LAMP 对田间草莓植株样品的检测

在杭州建德地区采集到 20 株疑似患有炭疽病的草莓植株样品, 分别在其有病状或没有明显病斑的短缩茎、茎秆、叶柄和叶等部位分别取样 100 mg, 利用上述 DNA 提取方法, 将 LFD 膜或者 PEG 上清液加入所建立的 LAMP 检测体系中。同时, LAMP 检测结果和组织分离结果相对比。组织分离方法如下: 取植物组织, 用 75 % 乙醇浸泡 30 s, 继而在 2 % 的 NaClO 溶液中浸泡 1 min, 最后用无菌水漂洗 3 次, 用无菌滤纸将水分吸干后切成 0.5 cm² 小块, 置于 PDA 表面, 在 25 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中黑暗培养 3 d, 待菌丝长出后, 挑取菌落边缘琼脂块到新的平板上进行纯化培养, 继代纯化 3 次后置于 PDA 斜面中 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

4.2 结果与分析

4.2.1 LAMP 检测最佳反应条件的确定

LAMP 检测反应温度设置一系列梯度: 59.0 $^{\circ}$ C、60.0 $^{\circ}$ C、61.0 $^{\circ}$ C、62.0 $^{\circ}$ C、63.0 $^{\circ}$ C、64.0 $^{\circ}$ C、65.0 $^{\circ}$ C、66.0 $^{\circ}$ C; 实验结果表明, 当温度为 66.0 $^{\circ}$ C 时扩增反应不能进行, 在 64.0 $^{\circ}$ C 和 65.0 $^{\circ}$ C 时, 反应管颜色变化明显, 且凝胶电泳条带清晰。在 64.0 $^{\circ}$ C 条件下分别设置反应时间: 15、30、40、50、60、70、80、90 min, 进行反应时间的优化; 实验结果表明, 在 64.0 $^{\circ}$ C 条件下反应 40-50 min 即可达到实验目的, 实现可视化检测 (图 6.1, 图 6.2)。

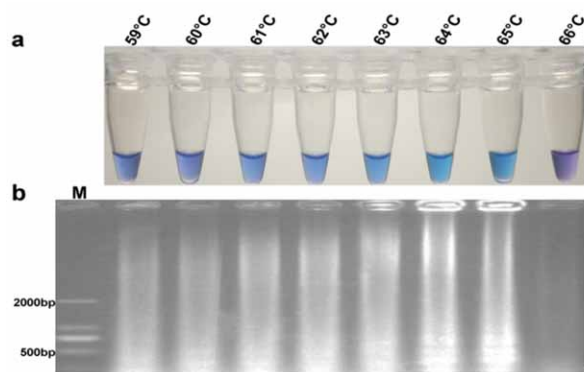


图 4.1 LAMP 反应温度优化. 反应温度分别设为 59.0 $^{\circ}$ C、60.0 $^{\circ}$ C、61.0 $^{\circ}$ C、62.0 $^{\circ}$ C、63.0 $^{\circ}$ C、64.0 $^{\circ}$ C、65.0 $^{\circ}$ C、66.0 $^{\circ}$ C. a: 温度梯度的 HNB 反应显色图; b: 温度梯度的凝胶电泳检测图

Figure 4.1: Optimization reaction temperature of the loop-mediated isothermal amplification

(LAMP) for detection of *Colletotrichum gloeosporioides*. a: HNB-based visual changes in colors from violet to sky blue; b: LAMP product detected on 1% agarose gel electrophoresis, Lane M represented the DL2000 DNA maker

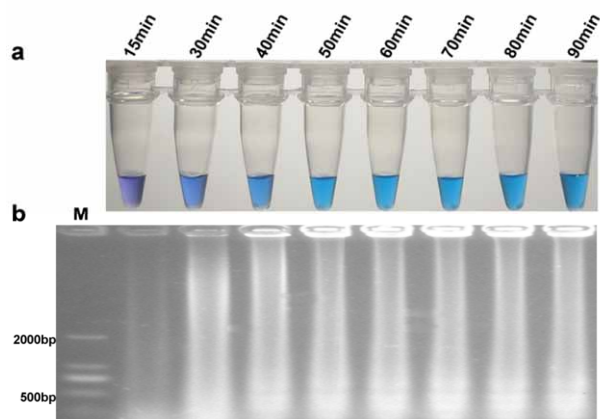


图 4.2 LAMP 反应时间优化. 反应时间分别设为 15 min、30 min、40 min、50 min、60 min、70 min、80 min、90 min. c: 反应时间的 HNB 反应显色图; b: 反应时间的凝胶电泳检测图
Figure 4.2 Optimization reaction time of the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of *Colletotrichum gloeosporioides*. a: HNB color changes in the LAMP reaction from violet to blue. b: LAMP product detected on 1% agarose gel electrophoresis

4.2.2 LAMP 检测的特异性

在本实验中, 利用所建立的 LAMP 体系对不同刺盘孢属的炭疽菌进行检测, 以验证该 LAMP 检测可以特异性检测出草莓胶孢炭疽菌, 结果表明, 其他刺盘孢属的真菌如黑色刺盘孢 (*C. atramentarium*)、平头炭疽菌 (*C. truncatum*) 和辣椒炭疽菌 (*C. capsici*) 的样品均呈阴性反应, 草莓灰霉病菌 (*B. cinerea*) 样品也无阳性反应, 只有胶孢炭疽菌 (*C. gloeosporioides*) 样品呈现阳性结果, 反应管由紫色变成天蓝色, 凝胶电泳有梯形条带出现; 而其他样品反应管保持紫色不变, 电泳检测无明显条带, 表明该 LAMP 检测具有较好的特异性。

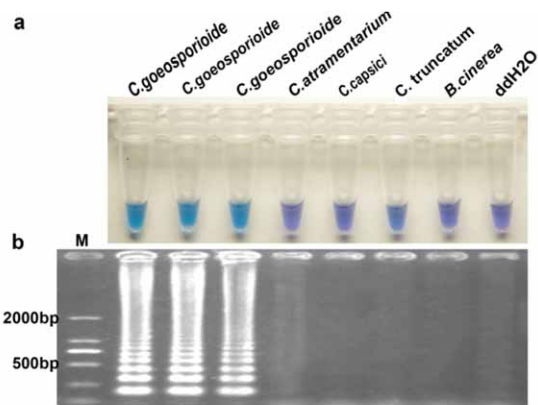


图 4.3 LAMP 检测不同种刺盘孢属炭疽菌和灰霉病菌；检测菌株分别为胶孢炭疽菌（*Colletotrichum gloeosporioides*）、墨色刺盘孢菌（*C. atramentarium*）、辣椒炭疽菌（*C. capsici*）、平头炭疽菌（*C. truncatum*）、灰葡萄孢菌（*Botrytis cinerea*）

Figure 4.3 LAMP detection of different species of *Colletotrichum* spp.(*C. gloeosporioides*, *C. atramentarium*, *C. capsici*, *C. truncatum*) and *Botrytis cinerea*

4.2.3 LAMP 检测灵敏度

10 倍梯度稀释提取的目标 DNA，使 DNA 浓度为 10 ， 10×10^{-1} ， 10×10^{-2} ， 10×10^{-3} ， 10×10^{-4} ， 10×10^{-5} ， 10×10^{-6} ， 10×10^{-7} ng/μl，分别以其为模板，进行 LAMP 和 PCR 扩增，对比 LAMP 和 PCR 的灵敏度，结果表明，本实验中草莓炭疽病 LAMP 检测其最低检测限为 10×10^{-2} ng/μl，PCR 的最低检测限为 10×10^{-1} ng/μl。LAMP 检测比常规 PCR 高 10 倍（图 4.4）。

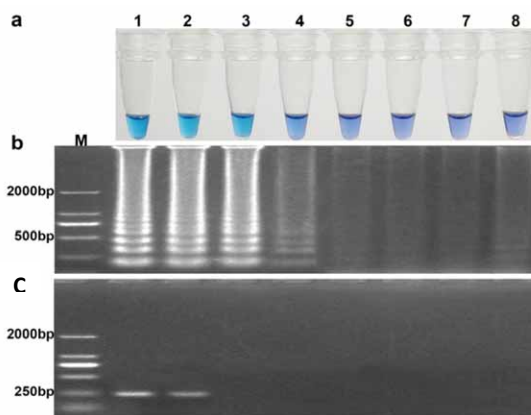


图 4.4 LAMP 和 PCR 检测限比较. 反应管 1-8 分别为十倍稀释的 DNA，1-8 管 DNA 浓度为： 10 ， 10×10^{-1} ， 10×10^{-2} ， 10×10^{-3} ， 10×10^{-4} ， 10×10^{-5} ， 10×10^{-6} ng/μl， 10×10^{-7} ng/μl. a: 灵敏度检测

HNB 反应显色图; b: LAMP 灵敏度检测凝胶电泳检测图; c: PCR 灵敏度检测凝胶电泳检测图

Figure 4.4 Sensitivity of LAMP to detect *Colletotrichum gloeosporioides* compared with conventional PCR. Lane M represented the DL2000 DNA marker. A serial dilutions of DNA templates containing 10, 10×10^{-1} , 10×10^{-2} , 10×10^{-3} , 10×10^{-4} , 10×10^{-5} , 10×10^{-6} , 10×10^{-7} ng/ μ l in a, b and c

4.2.4 LAMP 检测验证 LFD 和碱性 PEG 提取植物样品 DNA 可行性

用 LFD 处理植物组织样品,将 LFD 膜的一部分($\approx 5 \times 1 \text{ mm}$)直接添加到 LAMP 反应混合物中。结果表明,感染炭疽病菌的草莓组织样品在 LAMP 反应之后,反应管由反应前的紫色变成天蓝色,而健康的草莓植株样品在反应之后反应管保持紫色不变(图 4.5 a)。说明 LFD 成功从草莓植株上将草莓炭疽病菌 DNA 提取出来,且本实验的 LAMP 检测体系可以将草莓炭疽病菌特异性的检测出来。

10 mg 植物样品加入 100 μ L 碱性 PEG 中, 90 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min 以提取 DNA, 上清液加入 LAMP 体系中, 检测结果表明, 感染炭疽病菌的草莓组织样品呈阳性, 健康植株样品呈阴性(图 4.5 b), 表明碱性 PEG 可以直接提取植物样品 DNA。

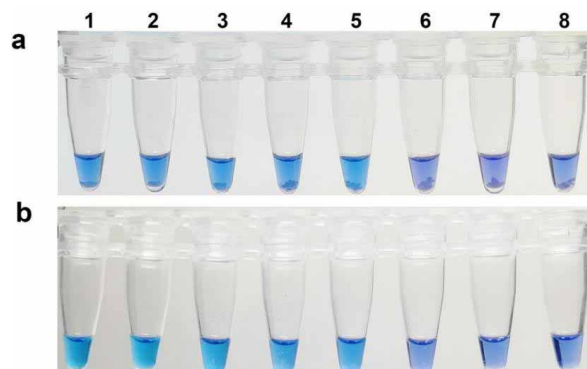


图 4.5 LAMP 检测验证两种提取植物样品 DNA 方法的可行性. a: LAMP 检测中 DNA 模板由 LFD 从植株上提取, b: LAMP 检测中 DNA 模板由碱性 PEG 从植株上提取, 管 1: 纯培养草莓炭疽病菌 DNA 阳性对照, 2-5: 炭疽菌侵染的植物样品, 6-8: 未受感染的草莓样品

Figure 4.5 Verifying the feasibility of two methods of DNA extraction from plant samples by LAMP assay. a: DNA template in LAMP assay was extracted from plants by LFD, b: DNA template in LAMP assay was extracted from plants by alkaline PEG. Tube 1: DNA of *C.gloeosporioides* by pure cultured as positive control, 2-5: Anthrax-infected strawberry plant sample, 6-8: Healthy plant samples。

4.2.5 LAMP 检测田间草莓炭疽病植株样品

利用上述植株样品前处理的方法，提取田间样品 DNA 进行 LAMP 检测，结果表明，在所采集到的 20 株疑似感染炭疽病草莓植株中，LAMP 检测呈阳性的植株数为 18 株，并且在短缩茎、茎秆和叶柄处均检测到阳性反应（图 4.6），叶片上都没有检测到阳性反应。其中大部分草莓植株的短缩茎靠近根部部分有维管束变色的现象，其他部位没有典型症状。组织分离结果表明，从 18 株 LAMP 检测呈阳性植株的短缩茎、茎秆和叶柄也都成功分离到炭疽菌菌株，菌株纯培养 7 d 后，培养基表面有粉红色分生孢子堆和黑色产孢结构出现，是典型的胶孢炭疽菌的形态特点（图 4.6），此外，从植株叶片部都没有分离到胶孢炭疽病原菌。

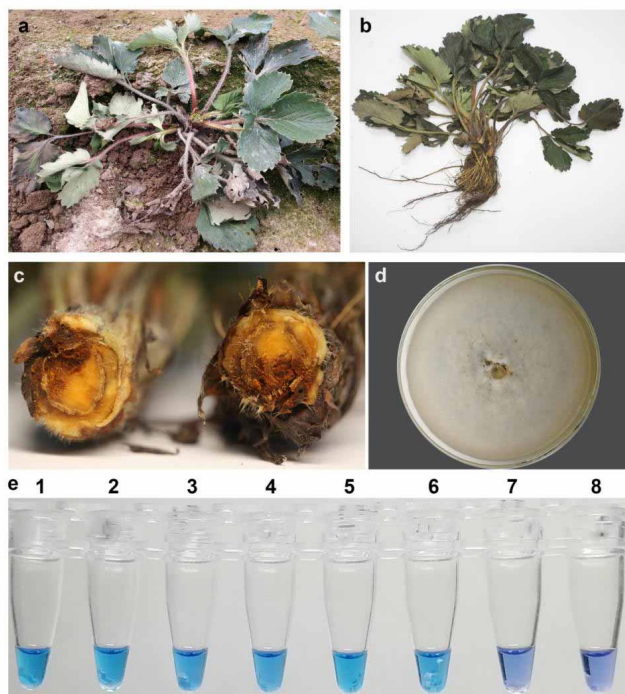


图 4.6 LAMP 检测田间草莓炭疽病植株样品. a, b: 田间患病植株形态; c: 典型炭疽菌造成草莓植株维管束变色形态特征; d: 分离到的草莓炭疽病菌在 PDA 培养基上的菌落形态特征; e: LAMP 检测草莓植株短缩茎、茎秆、叶柄和叶片带菌情况, 1-2: 短缩茎组织; 3-4: 茎秆组织; 5-6: 叶柄组织; 7-8: 叶片组织

Figure 4.6 LAMP assay for field sample of strawberry anthracnose plants. a, b: Morphology of diseased strawberry plants in the field; c: Typical morphology of vascular bundles of strawberry plants caused by *Colletotrichum gloeosporioides*; d: Morphology of *C. gloeosporioides* isolated on PDA medium; e: LAMP detection of strawberry plant including shortened stems, stalks, petiole and leaf, 1-2: shortened stem tissue; 3-4: stalk tissue; 5-6 petiole tissue; 7-8: leaf tissue

4.3 讨论

本章研究内容主要描述了一种病原菌现场快速检测的方法,和很多核酸检测技术相比,操作过程相对简单。包括样品前处理的核酸提取过程,整个检测可以在 1 h 内完成。当事先制备好 LAMP 检测体系,可在田间用 LFD 在 2 min 内快速从植物体上提取病原菌 DNA, LAMP 检测过程在恒温加热器中进行即可,一步法完成草莓炭疽病的快速田间检测的目的。之前也有报道利用磁珠法提取田间植物样品核酸,利用 real-time 进行病原菌的现场检测^[134],与 real-time PCR 相比,本实验中 LAMP 检测操作步骤更为简单,更适用于现场检测的要求。

本章研究中,利用 LFD 和碱性 PEG 两种方法来实现田间植物样品核酸的直接提取。LFD,一种横向测流装置,当植物样品在缓冲液中经过振荡释放核酸后,粗提取液加入横向测流装置中,经过毛细管过滤后,核酸就会被吸附到 LFD 膜上,而影响扩增的反应抑制物、杂质及色素都会留在膜的后方, LFD 膜上只留下纯净的核酸。LFD 膜是一种硝酸纤维素膜,可以稳定吸附核酸,之后把膜的一部分加入 LAMP 体系中作为模板, LAMP 就可以特异性检测出植株上特定致病病原菌存在与否。之前有研究报道了利用 LFD 联合 LAMP 来检测两种疫霉 *Phytophthora ramorum* 和 *P. kernoviae*^[132],本章研究是首次报道用 LFD 提取直接草莓植株核酸,再联合 LAMP 来检测草莓苗期炭疽病。

相比于 LFD 装置成本较高,碱性 PEG 溶液提取核酸的方法则更加经济。Chomczynski 等人开发了一种碱性裂解试剂,可以将多种生物样品直接用于 PCR,而无需进一步的中和或 DNA 分离,研究表明高浓度 (> 50%) 聚乙二醇 (PEG) 在碱性条件下 (pH > 13) 可满足要求,只需要将样品置于碱性 PEG 试剂中室温浸泡以裂解细胞并释放核酸,对于难裂解的样品可以 90 °C 加热 5-10 min 以加速裂解^[133]。本章研究也参考之前的研究描述,成功运用碱性 PEG 溶液实现植株样品核酸的提取。相比较而言,在本研究草莓炭疽病 LAMP 检测中,对于样品前处理 LFD 提取法更加快捷,而碱性 PEG 提取法更加经济。

传统的草莓炭疽病菌潜伏侵染检测中,有关于除草剂 paraquat (百草枯) 诱导刺盘孢 (*Colletotrichum* spp.) 发病的报道,百草枯能杀死植物组织并加速病原菌在组织内生长;以及利用低温冷冻法杀死植物组织,促进病原物生长和产孢的报道^[135]。本章研究中所开发的 LAMP 检测有望应用于苗期草莓炭疽病潜伏侵染的检测,达到快速筛选无菌种苗,预防炭疽病的发生,减少损失的目的,这还需要进一步对无症状植株检测的试验和验证。

5 草莓炭疽病菌抗 QoIs 类和苯并咪唑类杀菌剂的 LAMP 检测技术

如前几章所述,植物病原菌对苯并咪唑类杀菌剂抗性产生严重,本课题组在前期研究中也报道了浙江省葡萄炭疽病菌对苯并咪唑类杀菌剂的高水平抗性产生,葡萄炭疽病菌 *β-tubulin* 基因发生 E198A 突变,会导致高水平抗药性的产生^[71]。

目前在对炭疽病的控制和管理中,QoIs 类杀菌剂吡唑醚菌酯发挥着重要作用。据报道,不同刺盘孢属 *Colletotrichum* spp.,包括 *C. cereale*、*C. gloeosporioides* 和 *C. graminicola*^[136-138],都已经报道 QoIs 类杀菌剂高水平抗药性菌株。一般来说,大部分病原菌 *cytb* 基因上 143 位密码子 G143A 突变以及小部分 F129L 的突变导致 QoIs 杀菌剂的抗性。在目前情况下,需要采取环境友好和可持续的控制措施,要求更加智能地使用杀真菌剂,以延缓或管理病原体的抗性。

本章研究,首先测定了不同地点采集到的草莓炭疽病菌对上述两类药剂的抗药性,并分析抗药性机制,在此基础上开发 LAMP 检测体系,用于检测草莓炭疽病菌对 QoIs 类和苯并咪唑类杀菌剂的抗性发展情况。

5.1 材料与方法

5.1.1 供试药剂

97%甲基硫菌灵(Thiophanate-methyl)原药,由浙江威尔达化工有限公司提供;97%吡唑醚菌酯(Pyraclostrobin)原药,由江西正邦生物化工有限公司提供。

5.1.2 菌株的采集和分离

从浙江省杭州市、绍兴市、温州市、宁波市四个草莓产区,6 个设施草莓种植基地上,采集具有草莓炭疽病病状的植株,分别放入采样袋中,带回实验室进行分离保存。采用组织分离法对病原菌进行分离,具体方法如第 4 章第 4.1.6 节所述。

5.1.3 对杀菌剂的抗性测定方法

采用区分剂量法,测定所分离到草莓炭疽病菌菌株对两种药剂的抗性情况,方法如第 2 章第 2.1.9.3 节所述

5.1.4 *β-tubulin* 基因和 *cytb* 基因序列比较

随机挑选 10 株不同地点采集的草莓炭疽病菌,利用设计的引物 BETU-F1(CAGGTTCTCGATGTTGTCCG)和 BETU-R1(CCATCA TGTTCTTGGGGTCG)对菌株 *β-tubulin* 基因包含 198 和 200 位的片段进行扩增。使用引物 Hcytb-F(CCTTTTGGTGTTTTACTTATTG)和 Hcytb-F(TAATCGCCTACAGACTGG

GTCAC) 对炭疽菌株 *cytB* 基因包含 143 位片段进行扩增。扩增方法和产物分析方法同第 2 章第 2.1.9.4 节。

5.1.5 DNA 的提取

胶孢炭疽菌 ZJC15-3 为对吡唑醚菌酯和甲基硫菌灵的敏感菌株；ZJF-4 菌株 *cytB* 基因 143 位密码子发生点突变即 G143A (GGT→GCT)，对吡唑醚菌酯高度抗性，同时其 *β-tubulin* 基因第 198 位密码子发生点突变 E198A，对甲基硫菌灵也高抗。在 PDA 上纯培养 7 d 后利用真菌 DNA 快速抽提试剂盒（生物生工，上海）进行 DNA 提取。

5.1.6 LAMP 检测的引物设计和筛选

基于胶孢炭疽菌 *cytB* 基因 143 位突变位点，方法如第 2 章第 2.1.2 节所述，利用在线引物设计软件，在 FIP 3'端引入错配碱基的方法，错配出六套 LAMP 引物。以能特异性扩增出 G143A 突变体而不能扩增出敏感菌株样品的引物作为后续实验的 LAMP 引物。基于胶孢炭疽菌 *β-tubulin* 基因第 198 突变位点，设计四套错配 LAMP 引物。ZJC15-3 和 ZJF-4 菌株 DNA 分别为阳性和阴性模板。

表 5.1 LAMP 引物筛选
Table 5.1 Screening LAMP primer set

引物名称 Primer name	引物组 Primer set	用途 application	序列 Sequence (5'-3')
BE CYTB F3			GTATGTTTGTATGTTTTACCTTACG
BE CYTB B3			ACCTATAGTAGGAAAGAAATGCT
BE CYTB FIP1	S1		CTCCAATTCATGGGATAGCACTTATGGCAAATGTCATTA TGAGCC
BE CYTB FIP2	S2		CTCCAATTCATGGGATAGCACTTATGGCAAATGTCATTA TGAGCA
BE CYTB FIP3	S3		CTCCAATTCATGGGATAGCACTTATGGCAAATGTCATTA TGATCT
BE CYTB FIP4	S4	G143A 检测	CTCCAATTCATGGGATAGCACTTATGGCAAATGTCATTA TGATCA
BE CYTB FIP5	S5		CTCCAATTCATGGGATAGCACTTATGGCAAATGTCATTA TGAGCTC
BE CYTB FIP6	S6		CTCCAATTCATGGGATAGCACTTATGGCAAATGTCATTA TGAAC
BE CYTB BIP			TCGTTGAGTCAACAAACAATACAGTGCTGATAACCTAAT GGTCCTA
BE-198-F3	E198A		CCTACAACGCCACTCTCTCC
BE-198-B3	检测		CGCAGGTCAGAGTTCAGC

BE-198-FIP1	S7	ACAGCTTGAGGGTACGCATGCATGGTCGAGAACTCCGAC GCG
BE-198-FIP2	S8	ACAGCTTGAGGGTACGCATGCATGGTCGAGAACTCCGAC CCC
BE-198-FIP3	S9	ACAGCTTGAGGGTACGCATGCATGGTCGAGAACTCCGAC TCG
BE-198-FIP4	S10	ACAGCTTGAGGGTACGCATGCATGGTCGAGAACTCCGAC ACG
BE-198-BIP		CAACCCCTCTTACGGCGACCTTGACCCGGGAAACGCAG

5.1.7 草莓炭疽病抗药性 LAMP 检测体系的建立

以提取的菌株 ZJF-4 基因组 DNA 为模板，LAMP 体系各组分按照第 2 章第 2.2.7 节所述。对于 LAMP 反应条件，如同第 4 章第 4.1.3 节所述，设置一系列温度梯度 58.0 °C~67 °C，在最适温度下设置扩增时间 20 min~90 min，以优化出最佳反应程序；草莓炭疽病 LAMP 灵敏度测试具体也如第 4 章第 4.1.3 节所述，10 倍梯度稀释 DNA 模板，使 DNA 浓度为 10 ng/μL~10×10⁻⁷ ng/μL，对比 LAMP 和 PCR 的灵敏度，PCR 扩增使用引物 BE-198-F3 和 BE-198-B3。每个处理重复三次，实验重复三次，下同。

5.1.8 LAMP 检测体系准确度分析

以不同地区采集到的 10 株不同敏感型草莓炭疽病菌菌株 DNA 为模板，进行炭疽病抗药性 LAMP 检测准确度分析（菌株同 5.1.4）。

5.2 结果与分析

5.2.1 草莓炭疽病菌对杀菌剂的抗药性

对不同地区采集到的样品，经过组织分离纯化共得到 93 株草莓炭疽病菌。抗药性测定结果表明，甲基硫菌灵高水平抗药性菌株（HR）有 82 株，频率为 88.2%；敏感菌株（S）11 株，频率为 11.8%；没有检测到低水平抗药性菌株（LR）和中等水平抗药性菌株（MR）。各个地区采集的菌株的抗药性情况不同，如图表所示（图 5.1，附表 2）。同时检测了 93 株草莓炭疽病菌对吡唑醚菌酯的抗性，结果检测到敏感菌株（S）27 个，频率为 29.0%；高水平抗药性菌株（HR）66 个，频率为 71.0%，没有检测到低水平抗药性菌株（LR）和中等水平抗药性菌株（MR）。各个地区采集的菌株样品抗药性情况不同，如图表所示（图 5.1，附表 2）

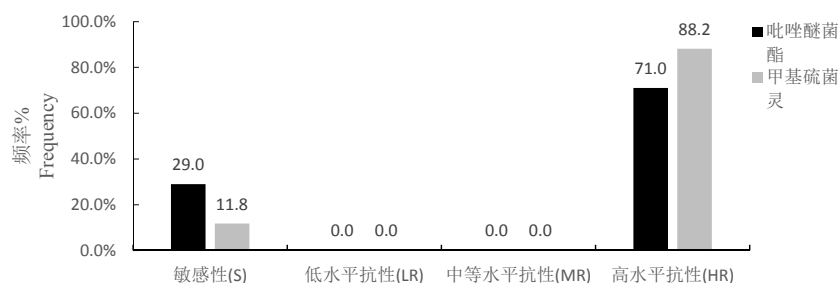


图 5.1 草莓炭疽病群体 (n=93) 对吡唑醚菌酯和甲基硫菌灵的抗性频率
Figure 5.1 Resistance frequency of populations of *Colletotrichum gloeosporioides* in strawberry to pyraclostrobin and thiophanate-methyl

5.2.2 对 QoIs 类和苯并咪唑类杀菌剂的抗性分子机制

通过引物 Hcytb-F 和 Hcytb-R 从不同敏感性草莓炭疽病菌菌株中扩增到 500 bp 左右的目标片段, 测序结果通过 BLAST 进行比对之后, 用 SeqBuilder 软件分析结果表明, 所有抗性菌株 *cytb* 基因上 143 位密码子均由 GGT→GCT, 导致第 143 位由甘氨酸突变为丙氨酸, 而敏感菌株 143 位均未发生突变。

143
↓

```

XSXS-3(S) ...TAC GGG CAA ATG TCA TTA TGA GGT GCA ACA...
          Y  G  Q  M  S  L  W  G  A  T
XSXS-4(S) ...TAC GGG CAA ATG TCA TTA TGA GGT GCA ACA...
          Y  G  Q  M  S  L  W  G  A  T
NBG-2(S) ...TAC GGG CAA ATG TCA TTA TGA GGT GCA ACA...
          Y  G  Q  M  S  L  W  G  A  T
NBG-8(R) ...TAC GGG CAA ATG TCA TTA TGA GCT GCA ACA...
          Y  G  Q  M  S  L  W  C  A  T
WZ1-1(R) ...TAC GGG CAA ATG TCA TTA TGA GCT GCA ACA...
          Y  G  Q  M  S  L  W  C  A  T
WZ7-4(R) ...TAC GGG CAA ATG TCA TTA TGA GCT GCA ACA...
          Y  G  Q  M  S  L  W  C  A  T
HZJ-1(R) ...TAC GGG CAA ATG TCA TTA TGA GCT GCA ACA...
          Y  G  Q  M  S  L  W  C  A  T
HZJ-2(S) ...TAC GGG CAA ATG TCA TTA TGA GGT GCA ACA...
          Y  G  Q  M  S  L  W  G  A  T
HJD-16(R) ...TAC GGG CAA ATG TCA TTA TGA GCT GCA ACA...
          Y  G  Q  M  S  L  W  C  A  T
HJD-46(S) ...TAC GGG CAA ATG TCA TTA TGA GGT GCA ACA...
          Y  G  Q  M  S  L  W  G  A  T
  
```

图 5.2 不同表现型草莓炭疽病菌株 *cytb* 基因部分氨基酸序列比对
Fig 5.2 Alignment of putative partial amino acid sequences of *cytb* gene between different phenotype strains isolates of *Colletotrichum gloeosporioides*

利用引物 BETU-F1 和 BETU-R1, 对 10 株不同敏感性菌株 *β-tubulin* 基因进行扩增, 扩增到 550 bp 左右的目标片段。测序结果表明, 共检测到三种基因型, 敏感菌株基因型: *β-tubulin* 198 和 200 位均未发生突变; 抗性菌株 R1 型: *β-tubulin* 基因 198 位密码子由 GAG→GCG, 由谷氨酸突变成为丙氨酸; 抗性菌株 R2 型: *β-tubulin* 基因 200 位密码子由 TTC→TAC, 由苯丙氨酸变为缬氨酸。

	198	200
	↓	↓
XSXS-3 (S) ...	TTC GAC GAG ACC TTC TGC ATT GAC ACC GAG...	
	S D E T F C I D N E	
XSXS-4 (S) ...	TTC GAC GAG ACC TTC TGC ATT GAC ACC GAG...	
	S D E T F C I D N E	
NBG-2 (R1) ...	TTC GAC GCG ACC TTC TGC ATT GAC ACC GAG...	
	S D A T F C I D N E	
NBG-8 (R1) ...	TTC GAC GCG ACC TTC TGC ATT GAC ACC GAG...	
	S D A T F C I D N E	
WZ1-1 (R1) ...	TTC GAC GCG ACC TTC TGC ATT GAC ACC GAG...	
	S D A T F C I D N E	
WZ7-4 (R1) ...	TTC GAC GCG ACC TTC TGC ATT GAC ACC GAG...	
	S D A T F C I D N E	
HZJ-1 (R1) ...	TTC GAC GCG ACC TTC TGC ATT GAC ACC GAG...	
	S D A T F C I D N E	
HZJ-2 (S) ...	TTC GAC GAG ACC TTC TGC ATT GAC ACC GAG...	
	S D E T F C I D N E	
HJD-16(R2) ...	TTC GAC GAG ACC TAC TGC ATT GAC ACC GAG...	
	S D E T Y C I D N E	
HJD-46(R2) ...	TTC GAC GAG ACC TAC TGC ATT GAC ACC GAG...	
	S D E T Y C I D N E	

图 5.3 不同表现型菌株 *β-tubulin* 基因部分氨基酸序列比对

Figure 5.3 Alignment of putative partial amino acid sequences of *β-tubulin* gene between different phenotype strains isolates of *Colletotrichum gloeosporioides*

5.2.3 LAMP 检测的特异性引物

对于 G143A 草莓炭疽病菌 LAMP 检测, 从设计和错配的六组 LAMP 引物中筛选到 1 套特异性 LAMP 引物, 使敏感菌株不能扩增出产物, 颜色显示为紫色, 琼脂糖凝胶电泳图谱无梯状条带 (图 5.3 a); 只有抗药性 G143A 菌株有特异性扩增, 显示为天蓝色, 琼脂糖凝胶电泳图谱呈梯状条带 (图 5.3 b)。即 S4 引物组可以将敏感菌株和抗性 G143A 菌株区分开, 可以特异性检测出 G143A 菌株样品。所以挑选引物 S4 进行下一步实验。草莓炭疽病菌 E198A-LAMP 引物筛

选表明，引物 S8 可以特异性检测出 E198A 突变基因型（图 5.4）

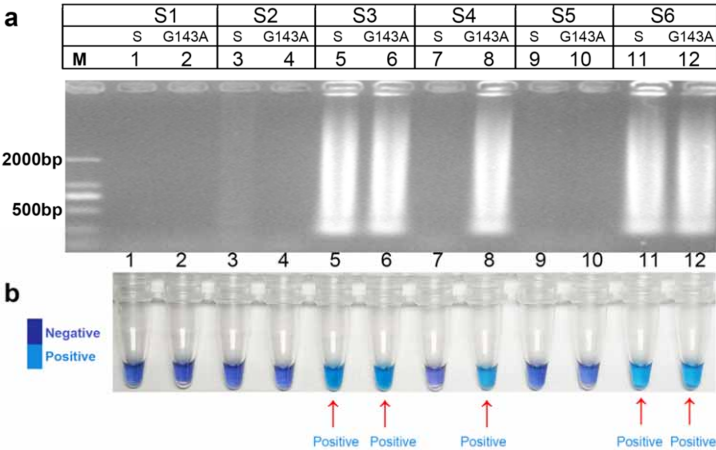


图 5.3 G143A-LAMP 特异性引物筛选, S 反应管中含有对吡唑醚菌酯敏感的草莓炭疽病菌 DNA 样品, G143A 反应管中含有 G143A 基因型草莓炭疽病菌 DNA 样品. a: LAMP 反应产物凝胶电泳图; b: LAMP 反应产物可视化 HNB 显色图, 红色箭头代表阳性反应

Figure 5.3 Determining six sets (S1–S6) of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) primers. Label 1,3,5,7,9,11: the template DNA was extracted from the pyraclostrobin sensitive strain (S). Label 2,4,6,8,10,12: the template DNA was extracted from the isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* with the G143A mutation. a: LAMP product detected on 1% agarose gel electrophoresis. Lane M represented the DL2000 DNA marker; b: HNB-based visual changes in colors. The positive samples were pointed out by red arrows.

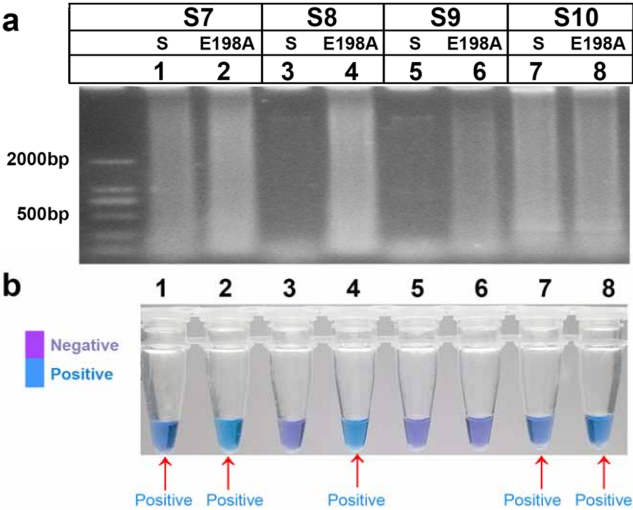


图 5.4 E198A-LAMP 特异性引物筛选, 反应管 1, 3, 5, 7 中含有对甲基硫菌灵敏感的草莓炭疽

病菌 DNA 样品, 反应管 2, 4, 6, 8 中含有 E198A 基因型草莓炭疽病菌 DNA 样品. a: LAMP 反应产物凝胶电泳图; b: LAMP 反应产物可视化 HNB 显色图,

Figure 5.4 Deter mining six sets (S7–S10) of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) primers. Label 1,3,5,7: the template DNA was extracted from the thiophanate-methyl sensitive strain (S). Label 2,4,6,8: the template DNA was extracted from the isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* with the E198A mutation. a: LAMP product detected on 1% agarose gel electrophoresis. Lane M represented the DL2000 DNA marker; b: HNB-based visual changes in colors. The positive samples were pointed out by red arrows.

5.2.4 G143A 草莓炭疽病菌 LAMP 检测最佳反应条件

G143A 草莓炭疽病菌 LAMP 检测反应温度设置为 58.0 °C、59.0 °C、60.0 °C、61.0 °C、62.0 °C、63.0 °C、64.0 °C、65.0 °C、66.0 °C、67.0 °C, 结果表明温度高于 65.0 °C 时扩展反应不能进行, 62 °C 到 63 °C 时反应管颜色变化明显, 凝胶电泳条带清晰。在 62 °C 条件下设置反应时间 20、30、40、50、60、70、80、90 min。结果表明在 62-63 °C 条件下反应 40-50 min 即可达到实验目的 (图 5.5, 图 5.6,)。

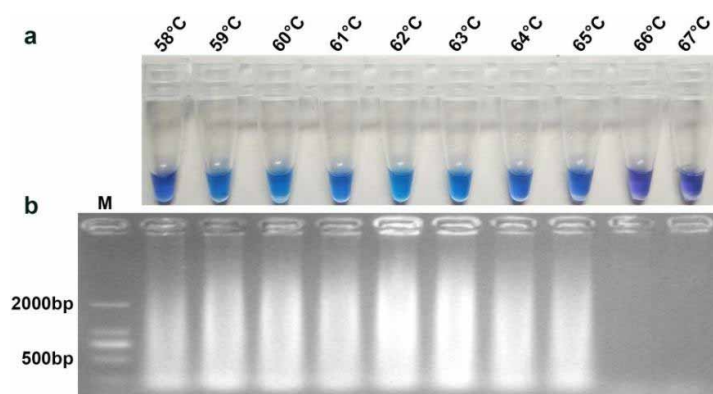


图 5.5 最佳反应温度的优化, 反应温度分别设为 58.0°C、59.0°C、60.0°C、61.0°C、62.0°C、63.0°C、64.0°C、65.0°C、66.0°C、67.0°C. a: 温度梯度的 HNB 反应显色图; b: 温度梯度的凝胶电泳检测图

Figure 5.5: Optimization reaction temperature of the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of the G143A mutant genotype of *Colletotrichum gloeosporioides* (a) HNB-based visual changes in colors from violet to sky blue. (b) LAMP product detected on 1% agarose gel electrophoresis. Lane M represented the DL2000 DNA marker

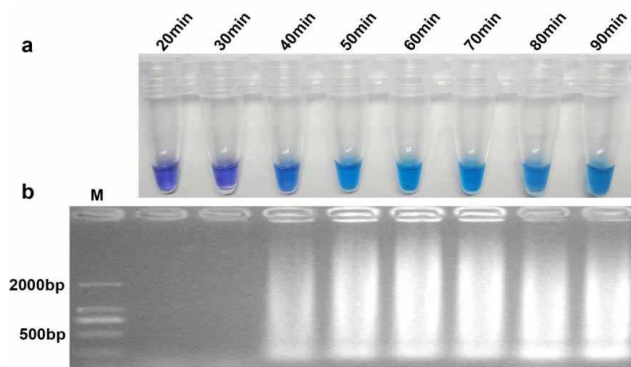


图 5.6 最佳反应时间的优化. 反应时间分别设为 20 min、30 min、40 min、50 min、60 min、70 min、80 min、90 min. a: 反应时间的 HNB 反应显色图;b: 反应时间的凝胶电泳检测图
Figure 5.6 Optimization reaction time of the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of the G143A mutant genotype of *Colletotrichum gloeosporioides*. a: HNB color changes in the LAMP reaction from violet to blue. b: LAMP product detected on 1% agarose gel electrophoresis. Lane M represented the DL2000 DNA marker

5.2.5 G143A 草莓炭疽病菌 LAMP 的检测限

10 倍梯度稀释的提取的目标 DNA，使 DNA 浓度为 10 ， 10×10^{-1} ， 10×10^{-2} ， 10×10^{-3} ， 10×10^{-4} ， 10×10^{-5} ， 10×10^{-6} ， 10×10^{-7} ng/ μ L。分别以其为模板，进行 LAMP 和 PCR 扩增，对比 LAMP 和 PCR 的灵敏度，结果表明本试验中，G143A 突变型 LAMP 检测其最低检测限为 10×10^{-3} ng/ μ L，PCR 的最低检测限为 10×10^{-2} ng/ μ L。LAMP 检测比常规 PCR 高 10 倍。

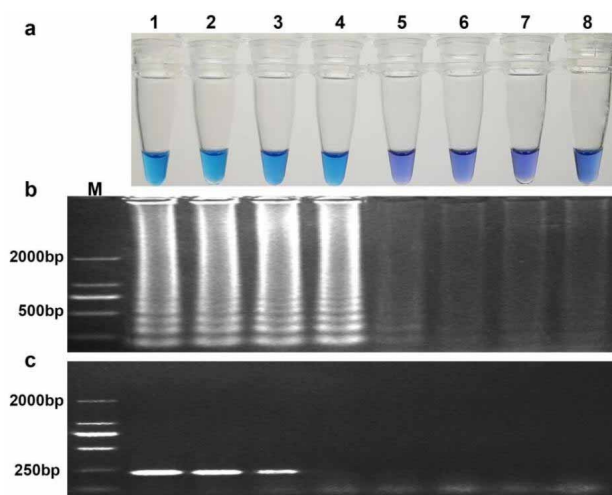


图 5.7 LAMP 灵敏度和 PCR 比较. 反应管 1-7 分别为 10 倍稀释的裂解产物，管 1-8DNA 浓度

为: 10, 10×10^{-1} , 10×10^{-2} , 10×10^{-3} , 10×10^{-4} , 10×10^{-5} , 10×10^{-6} , 10×10^{-7} ng/ μ L. a: 灵敏度检测 HNB 反应显色图, b: LAMP 灵敏度检测凝胶电泳检测图; c: PCR 灵敏度检测凝胶电泳检测图

Figure 5.7 Sensitivity of LAMP to detect the G143A mutant genotype of *Colletotrichum gloeosporioides* compared with conventional PCR. Lane M represented the DL2000 DNA marker. A serial dilutions of DNA templates containing 10, 10×10^{-1} , 10×10^{-2} , 10×10^{-3} , 10×10^{-4} , 10×10^{-5} , 10×10^{-6} , 10×10^{-7} ng/ μ L in a, b and c

5.2.6 G143A 草莓炭疽病菌 LAMP 检测的准确度

基于上述结果, 10 株来自不同地区对 QoI 类杀菌剂不同敏感表型的草莓炭疽病菌菌株的 DNA 进行了 LAMP 检测, 其中 5 株对 QoI 类杀菌剂抗性的草莓炭疽病菌菌株均发生了 G143A。基于 HNB 的可视化, 表明 LAMP 检测到所有突变体都是阳性反应的, 敏感的菌株株显示阴性结果, 与 MIC 结果 (最小抑制浓度) 和测序结果一致 (图 5.8, 图 5.2)

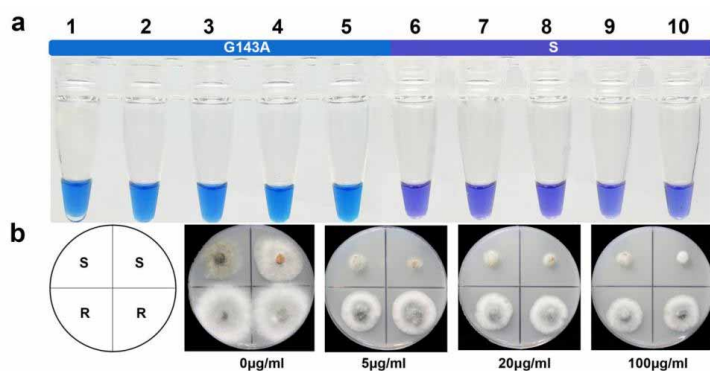


图 5.8 通过 LAMP 和 MIC 检测来自不同地理区域的草莓炭疽病菌菌株 G143A 突变体. a: LAMP 反应中的 HNB 颜色变化. 1-5 管:具有 G143A 突变的草莓炭疽病菌, 6-10 管对 QoIs 敏感性草莓炭疽病菌. b: MIC 方法检测场样品, S 表示 QoIs 敏感菌株, R 表示 QoI 抗性菌株

图 5.8 *Colletotrichum gloeosporioides* G143A mutants from different geographical regions were detect by LAMP assay and MIC testing. a: HNB color changes in the LAMP reaction. Labels 1 to 6: isolates with G143A mutation of *C. gloeosporioides*, Label 7 to 10: *C. gloeosporioides* isolates with QoIs-sensitive. b: MIC method detection field samples, S represents QoIs-sensitive strain, R represents strain of QoI-resistance

5.3 讨论

本章研究内容是关于抗 QoI 类杀菌剂草莓炭疽病菌 LAMP 检测的首次报道, 经过错配碱基设计, LAMP 引物可以区分敏感和高抗菌菌株。为了测试 LAMP 检测的适应性, 对不同地理位置采集到的草莓炭疽病菌菌株, 均能特异性检测出 G143A 突变菌株, 说明本研究中 LAMP 体系可以稳定检测。

本研究中还筛选出了一套特异性 LAMP 引物 (S8) 用来检测草莓炭疽病菌对苯并咪唑类杀菌剂高抗 E198A 基因型, 检测体系和前几章描述类似 (相关数据未呈现), 能特异性检测出 E198A 草莓炭疽病菌突变体。对于抗药性病害的 LAMP 检测, 之前有研究报道了关于核盘菌和禾谷镰刀菌抗苯并咪唑类杀菌剂 F200Y 突变体的 LAMP 检测, 在 LAMP 引物 FIP 3'端 3 到 5 个碱基处引入错配碱基, 从而成功检测高抗菌株; 为了提高反应速率, 加入了环引物, 可将检测时间缩短到 15 min^[114-115]。

笔者认为在后续研究中也可以引入环引物来缩短反应时间, 但可能会使假阳性风险增加。对于假阳性污染的是 LAMP 检测中一大严重问题, 本研究采用 HNB 染料, 避免了使用 SYBR I 染料需要开盖加入造成假阳性, 而 Tao 等人报道了一种通过在反应开始之前将含有高敏感 DNA 荧光染料 SYBR Green I 的微晶蜡胶囊加入到常规的 LAMP 反应管中, 随着反应的进行蜡会融化, 在反应结束时使染料自动进入 LAMP 混合液, 同时也营造了一种相对密封的反应环境, 大大减少了假阳性污染^[139]。

总之本章研究开发了一种抗 QoI 类杀菌剂草莓炭疽病菌 LAMP 检测体系, 以及筛选出一套抗苯并咪唑类杀菌剂草莓炭疽病菌 LAMP 检测引物, 但本章研究中只是针对病原菌的检测, 实现直接植株检测及现场应用还需更多的实验验证, 本研究为进一步实现草莓抗药性病害的田间 LAMP 检测奠定基础。

6 全文总结

6.1 建立了一种环介导的等温扩增 (LAMP) 检测体系, 能快速检测灰葡萄孢菌 *β-tubulin* 基因上 E198A 突变基因型 (对苯并咪唑类杀菌剂高抗), 基于 198 位 GAG→GCG, 设计错配引物特异性检测出 E198A 突变体, 灰霉病菌 E198A 基因型的 LAMP 检测的最佳反应条件为 64 °C, 60 min。该 LAMP 的检测限为 100 拷贝, 是 PCR 的 10 倍。LAMP 结果和区分剂量法的检测结果比较, 表明了本研究中 LAMP 检测草莓灰霉病菌 E198A 突变体可以达到 100 % 的精确性。LAMP 和区分剂量法及 PCR 结果表明, 浙江省不同产区的草莓灰霉病菌群体对甲基硫菌灵产生高水平抗性频率已高达 68%, 其中大部分为 Ben R1 型菌株, 其 *β-tubulin* 基因上 198 位密码子由 GAG 突变为 GCG (E198A), 少量 Ben R3 型菌株, 表现为 198 位密码子由 GAG 突变为 GTG (E198V)。

6.2 建立了 LAMP 快速检测体系, 用于田间灰葡萄孢菌对甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂 (QoIs) 的抗性监测和抗性发展风险评估, 其中包含两个 LAMP 检测, 其中 G143A-LAMP 能准确检测到灰霉病菌对 QoI 类杀菌剂具有高度抗性的 G143A 突变体, 检测结果与区分剂量法一致; 其二 BCbi143 / 144 - LAMP 能检测出灰葡萄孢 *cytb* 基因上 BCbi143 / 144 内含子, 检测结果与 PCR 扩增结果一致。LAMP 测定的最佳反应条件为 61 °C, 50 min, LAMP 检测限为 100×10^{-4} ng / μl。使用 ALL-DNA-Fast-Out 在 10 min 内对田间样品进行前处理后直接进行 LAMP 测定, 以实现一步法快速检测。总之, 本研究建立了一个快速灵敏的 LAMP 测定系统, 用于灰霉病菌对 QoIs 杀菌剂抗性风险评估和监测田间抗药性。

6.3 开发了一种直接用于从植株体上检测草莓炭疽病的 LAMP 快速检测体系, 采用 LFD (横向侧流试纸) 及碱性聚乙二醇浸提等方法, 短时间内完成田间样品前处理。本研究结果表明, 包含核酸提取过程可在 1 h 内完成检测, 达到快速检测田间草莓炭疽病的目的。

6.4 区分剂量法检测到浙江省不同地区草莓炭疽病菌对甲基硫菌灵的高水平抗性频率为 88.2 %, 检测到两种草莓炭疽病菌抗性表型, Ben R1 型菌株, 其 *β-tubulin* 基因上 198 位密码子由 GAG 突变为 GCG (E198A) 和 Ben R2 型菌株, 第 200 位密码子 TTC→TAC (F200Y); 草莓炭疽病菌对吡唑醚菌酯为代表的 QoIs 类杀菌剂的抗性频率为 71.0 %; 建立了 LAMP 快速检测体系, 优化了反应条件, 用于特异性检测草莓胶孢炭疽菌对 QoIs 类杀菌剂高抗 G143A 突变基因型。对不同地理位置不同敏感性菌株检测结果和区分剂量法结果一致, 表明该 LAMP 体系有很好的准确度; 筛选出一套 LAMP 引物用于检测草莓炭疽病菌苯并咪唑类高抗 E198A 的突变体。

参考文献

- [1] 姜卓俊. 草莓品种类型与栽培形式[J]. 中国果树, 2001, 1(2): 47-48.
- [2] 雷家军, 代汉萍, 谭昌华, 等. 中国草莓属(*Fragaria*)植物的分类研究[J]. 园艺学报, 2006, 33(1): 1-5.
- [3] 李好琢. 栽培种草莓的起源、演化和传播[J]. 中国种业, 2005(5): 65-65.
- [4] 赵密珍, 王静, 王壮伟, 等. 世界草莓产业发展现状及江浙沪草莓产业可持续发展对策[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(2): 1-2.
- [5] 张欣馨, 王菲, 李浪, 等. 中国草莓生产中面临的主要问题及发展对策[J]. 中国林副特产, 2016(2): 92-96.
- [6] 叶琪明, 李振, 包环玉, 等. 草莓病害调查初报[J]. 江西果树, 1998, (3): 29-32.
- [7] LIS H. Defying strawberry disease[J]. *American Fruit Grower*, 2001, 121(12): 7-8.
- [8] LEGARD D E, Mertely J C, Chandler C K, et al. Management of strawberry diseases in the 21st century: chemical and cultural control of botrytis fruit rot[C]. Strawberry research to 2001. Proceedings of the 5th North American Strawberry Conference. 2002: 58-63.
- [9] 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]. 果农之友, 2015(2): 49-50.
- [10] 陈治芳, 王文桥, 韩秀英, 等. 灰霉病化学防治及抗药性研究进展[J]. 河北农业科学, 2010, 14(8): 19-23.
- [11] 白小东, 毕阳, 李永才, 等. 果蔬采后病害的潜伏侵染机理研究进展[J]. 食品科学, 2015, 36(7): 278-282.
- [12] 郁国芳, 郑莉, 毛程亮, 等. 草莓灰霉病发生规律及无公害防治技术[J]. 上海农业科技, 2006(1): 122-123.
- [13] 肖长坤, 高苇, 夏冰, 等. 设施栽培草莓灰霉病发生规律及其综合防治[J]. 中国植保导刊, 2012, 32(9): 24-26.
- [14] 卫梅, 武旭霞, 郭艳. 设施草莓灰霉病的发生及无公害综合防治[J]. 山西果树, 2012(5): 31-32.
- [15] 任秀云, 吕德国, 安志强. 草莓灰霉病菌及其生理特性的研究[J]. 北方果树, 1992(3): 18-19.
- [16] 孙健健. 灰霉病的微生物防治研究进展[J]. 天津化工, 2012, 26(4): 11-14.
- [17] 孟祥东, 傅俊范, 周如军, 等. 保护地主要园艺作物灰霉病菌生物学特性比较研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2007, 38 (3): 322-326.
- [18] ELAD Y, SHABI E, KATAN T. Negative cross resistance between benzimidazole and N-phenylcarbamate fungicides and control of *Botrytis cinerea* on grapes[J]. *Plant Pathology*, 1988, 37(1): 141-147.
- [19] 李明远, 李兴红, 严红, 等. 蔬菜灰霉病的发生与防治[J]. 植保技术与推广, 2002, 22(1): 31-33.
- [20] 陈宇飞, 文景芝, 李立军. 葡萄灰霉病研究进展[J]. 东北农业大学学报, 2006, 37(5): 693-699.
- [21] 刘长令, 翟煜鑫, 张运晓, 等. 防治灰霉病用杀菌剂的开发[J]. 农药, 2000, 39(3): 1-6.
- [22] LEROUX P. *Chemical Control of Botrytis and its Resistance to Chemical Fungicides* [M] *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Springer Netherlands, 2007: 195-222
- [23] KOROLEV N, MAMIEV M, ZAHAVI T, et al. Resistance to fungicides among *Botrytis*

- cinerea* isolates from tomato and other hosts in Israel[J]. *Acta Horticulturae*, 2009, 808(808): 367-376.
- [24] BARDAS G A, THOMAS V, OLGA K, et al. Multiple resistance of *Botrytis cinerea* from kiwifruit to SDHIs, QoIs and fungicides of other chemical groups [J]. *Pest Management Science*, 2010, 66(9): 967-73.
- [25] ZHAO H, KIM Y K, HUANG L, et al. Resistance to thiabendazole and baseline sensitivity to fludioxonil and pyrimethanil in *Botrytis cinerea*, populations from apple and pear in Washington State[J]. *Postharvest Biology & Technology*, 2010, 56(1): 12-18.
- [26] 周明国, 叶钟音. 植物病原菌对苯并咪唑类及相关杀菌剂的抗药性[J]. 植物保护, 1987(2): 21-33
- [27] ROSSLENBROICH H J, STUEBLER D. *Botrytis cinerea* - history of chemical control and novel fungicides for its management [J]. *Crop Protection*, 2000, 19(s8-10): 557-561.
- [28] 周明国, 叶钟音, 刘经芬. 南京市郊灰霉菌对苯并咪唑类杀菌剂田间抗性的检测[J]. 南京农业大学学报, 1987(2):54-58
- [29] 陆悦健. 抗苯并咪唑的小麦赤霉病菌 β -tubulin 基因序列分析与特性研究[J]. 植物病理学报, 2000, 30(1): 30-34
- [30] 张传清, 张雅, 魏方林,等. 设施蔬菜灰霉病菌对不同类型杀菌剂的抗性检测[J]. 农药学报, 2006, 8(3): 245-249.。
- [31] BANNNO S, FUKUMORI F, ICHIISHII 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.
- [32] KOENRAADT H, SOMERVILLE S C, JONES A L. Characterization of mutations in the beta-tubulin gene of benomyl-resistant field strains of *Venturia inaequalis* and other plant pathogenic fungi[J]. *Phytopathology*, 1992, 82(11): 1348-1354.
- [33] 刘慧平, 韩巨才, 阎秀琴, 等. 灰霉病原菌对多菌灵的抗性监测[J]. 山西农业大学学报: 自然科学版, 2003, 23(2): 93-97.
- [34] NORTHOVER J. Persistence of dicarboximide-resistant *Botrytis cinerea* in Ontario vineyards[J]. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 1988, 10(2): 123-132.
- [35] KATO T, SUZUKI K, TAKAHASHI J, et al. Negatively correlated cross-resistance between benzimidazole, fungicides and methyl N-(3,5-dichlorophenyl) carbamate in phytopathogenic fungi[J]. *Journal of Pesticide Science*, 1984, 179(3): 489-495
- [36] 纪明山, 程根武. 灰霉病菌对多菌灵和乙霉威抗性研究[J]. 沈阳农业大学学报, 1998(3): 213-216.
- [37] 丁中, 刘峰, 慕立义. 不同抗性型灰葡萄孢菌 *Botrytis cinerea* 对不同作用机制杀菌剂的敏感性研究[J]. 农药学报, 2001, 3(4): 59-63.
- [38] 韩巨才, 刘慧平, 闫秀琴,等. 灰霉病菌对三种杀菌剂的抗性表现型分布及稳定性测定 [J]. 农药学报, 2004, 6(3): 43-47.
- [39] 王美琴, 赵晓军, 张鑫,等. 黄瓜灰霉病菌对多菌灵、速克灵及乙霉威的抗性检测[J]. 山西农业科学, 2011, 39(8): 853-855.
- [40] 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.
- [41] WANG Z N, COLEY-SMITH J R, WAREING P W. Dicarboximide resistance in *Botrytis cinerea* in protected lettuce[J]. *Plant Pathology*, 2010, 35(4): 427-433.
- [42] 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.
- [43] LEROCH M, SCALLIET G, HAHN M, et al. Gray mold populations in German strawberry fields show multiple fungicide resistance and are dominated by a novel clade close to *Botrytis cinerea*[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2012, 79(1): 159-167.
- [44] 皇甫运红, 戴德江, 时浩杰,等. 浙江省果蔬灰霉病菌对啞菌酯的抗药性研究[J]. 农药学报, 2013, 15(5): 504-510.
- [45] KOJIMA K, TAKANO Y A, TANAKA C, et al. Fungicide activity through activation of a fungal signalling pathway[J]. *Molecular Microbiology*, 2004, 53(6): 1785-1796.
- [46] LEROUX P, GREDET M, LEROCH M, et al. Exploring Mechanisms of Resistance to Respiratory Inhibitors in Field Strains of *Botrytis cinerea*, the Causal Agent of Gray Mold[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2010, 76(19): 6615-6630.
- [47] MA Z, YAN L, 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 & Physiology*, 2007, 88(3): 300-306.
- [48] FERNÁNDEZORTUÑO D, BRYSON P K, GRABKE A, et al. First report of fludioxonil resistance in *Botrytis cinerea* from a strawberry field in Virginia[J]. *Plant Disease*, 2013, 97(6): 848-848.
- [49] HILBER U W, HILBERBODMER M. Genetic basis and monitoring of resistance of *Botryotinia fuckeliana* to anilinopyrimidines[J]. *Plant Disease*, 1998, 82(5): 496-500.
- [50] 朱丽华,田间番茄灰霉病菌菌株对杀菌剂抗性的机理[J]. 世界农药, 2003, 25(3): 39-44.
- [51] 亦冰. 新颖杀菌剂—啞酰菌胺[J]. 世界农药, 2006, 28(5): 51-53.
- [52] 皇甫运红. 果蔬灰霉病菌对两种呼吸抑制剂的抗药性研究[D]. 浙江农林大学, 2014.
- [53] AVENOT H F, MICHAILIDES T J. Progress in understanding molecular mechanisms and evolution of resistance to succinate dehydrogenase inhibiting (SDHI) fungicides in phytopathogenic fungi[J]. *Crop Protection*, 2010, 29(7): 643-651.
- [54] BROOKS A N. Anthracnose of Strawberry caused by *Colletotrichum fragariae*, n. sp[J]. *Phytopathology*, 1931, 21(7): 739-744.
- [55] MASS J L. Anthracnose of strawberry fruit in Maryland[J]. *Plant disease*, 1978, 62: 488-492.
- [56] FREEMAN S, HOROWITZ S, SHARON A. Pathogenic and nonpathogenic lifestyles in *Colletotrichum acutatum* from strawberry and other plants[J]. *Phytopathology*, 2001, 91(10): 986-992.
- [57] XIAO C L, MACKENZIE S J, LEGARD D E. Genetic and pathogenic analyses of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from strawberry and noncultivated hosts[J]. *Phytopathology*, 2004, 94(5): 446.
- [58] DAMM U, CANNON P F, WOUTENBERG J H C, et al. The *Colletotrichum acutatum*, species complex[J]. *Studies in Mycology*, 2012, 73(1): 37-113.
- [59] HAN Y C, ZENG X G, XIANG F Y, et al. Distribution and characteristics of *Colletotrichum* spp. associated with anthracnose of strawberry in Hubei, China: an international journal of applied plant pathology[J]. *Plant Disease*, 2015, 100(5): 996-1006.
- [60] WEIR B S, JOHNSTON P R, DAMM U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex[J]. *Studies in Mycology*, 2012, 73(1): 115.
- [61] 韩国兴, 礼茜, 孙飞洲,等. 杭州地区草莓炭疽病原鉴定及其对多菌灵和乙霉威的抗药性[J]. 浙江农业科学, 2009(6): 1169-1172.
- [62] 白小东, 毕阳, 李永才,等. 果蔬采后病害的潜伏侵染机理研究进展[J]. 食品科学,

- 2015(7): 278-282.
- [63] 林春花, 胡美姣. 炭疽菌潜伏侵染研究进展[J]. 热带农业科学, 2004, 24(3): 57-63.
- [64] SOYTONG K, SRINON W, Rattanacherdchai K, et al. Application of antagonistic fungi to control anthracnose disease of grape[J]. *Journal of Agricultural Research & Extension*, 2005(1): 33-41.
- [65] KHAN S H, AKED J, MAGAN N. Control of the anthracnose pathogen of banana (*Colletotrichum musae*) using antioxidants alone and in combination with thiabendazole or imazalil[J]. *Plant Pathology*, 2001, 50(5): 601-608.
- [66] 吴祥, 吉沐祥, 陈宏州, 等. 句容地区草莓炭疽病原菌的鉴定及防治药剂筛选[J]. 江苏农业学报, 2013, 29(6): 1510-1513
- [67] BARBARA J. Smith. Strawberry anthracnose: progress toward control through science[J]. *International Journal of Fruit Science*, 2013, 13(1-2): 91-102.
- [68] PAVAN W, FRAISSE C W, PERES N A. Development of a web-based disease forecasting system for strawberries[J]. *Computers & Electronics in Agriculture*, 2011, 75(1): 169-175.
- [69] Fungicide Resistance Action Committee. Fungicides sorted by mode of action (including FRAC Code numbering). *FRAC Code List*, 2012.
- [70] 李洋, 刘长远, 陈秀蓉, 等. 辽宁省葡萄炭疽菌鉴定及对多菌灵敏感性研究[J]. 植物保护, 2009, 35(4): 74-77.
- [71] 叶佳, 张传清. 葡萄炭疽病菌对甲基硫菌灵、戊唑醇和醚菌酯的敏感性检测[J]. 农药学报, 2012, 14(1): 111-114.
- [72] SANDERS G M, KORSTEN L, WEHNER F C. Survey of fungicide sensitivity in *Colletotrichum gloeosporioides* from different avocado and mango production areas in south Africa[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2000, 106(8): 745-752.
- [73] 陈聃, 时浩杰, 吴慧明, 等. 浙江省葡萄炭疽菌对甲基硫菌灵和戊唑醇的抗性研究[J]. 果树学报, 2013(4): 665-668.
- [74] 李富根, 吴新平, 刘乃焱. 戊唑醇的作用特点及其应用概况[J]. 农药科学与管理, 2001, 22(3): 40-41.
- [75] 许文耀, 林成辉. 溴菌腈-多菌灵混剂对柑橘炭疽病的防治效果[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2002, 31(4): 459-462.
- [76] 邓维萍, 杨敏, 杜飞, 等. 葡萄胶孢炭疽菌对 3 种麦角甾醇脱甲基抑制剂类杀菌剂的敏感性[J]. 农药学报, 2011, 13(3): 245-252.
- [77] DÉLYE C, LAIGRET F, CORIO-COSTET M. New tools for studying epidemiology and resistance of grape powdery mildew to DMI fungicides[J]. *Pest Management Science*, 2015, 51(3): 309-314.
- [78] LUO C X, SCHNABEL G. Adaptation to fungicides in *Monilinia fructicola* isolates with different fungicide resistance phenotypes[J]. *Phytopathology*, 2008, 98(2): 230-238.
- [79] MA Z, 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.
- [80] 赵建江, 李红霞, 王文桥, 等. 番茄叶霉病菌对啞菌酯的抗性检测及抗性风险评估[J]. 农药学报, 2008, 10(1): 47-52.
- [81] 何秀玲, 张一宾. 甲氧基丙烯酸酯类和酰胺类杀菌剂品种市场和抗性发展情况[J]. 世界农药, 2013, 35(3): 14-19.
- [82] 肖敏, 曾向萍, 严婉荣, 等. 节瓜炭疽病菌对啞菌酯的敏感性及其交互抗性[J]. 贵州农

- 业科学, 2016, 44(2): 85-88.
- [83] 贾俊超, 马琳, 范志金, 等. 病原菌对 Strobilurin 类杀菌剂抗药性机理的研究进展[J]. 农药学报, 2008, 10(1): 1-9.
- [84] 杨腊英, 黄华平, 唐复润, 等. 香蕉炭疽菌 rDNA ITS 区的分子鉴定与检测[J]. 植物病理学报, 2006, 36(3): 219-225.
- [85] 江晶, 江彤, 李瑞, 等. 苹果炭疽菌的分子鉴定与检测[J]. 激光生物学报, 2010, 19(5): 695-699.
- [86] SIAH A, ELBEKALI A Y, RAMDANI A, et al. QoI Resistance and mitochondrial genetic structure of *Zymoseptoria tritici* in Morocco[J]. *Plant Disease*, 2014, 98(8): 1138-1144.
- [87] LUCK J E, GILLINGS M R. Rapid identification of benomyl resistant strains of *Botrytis cinerea* using the polymerase chain reaction[J]. *Mycological Research*, 1995, 99(12): 1483-1488.
- [88] KOENRAADT H, JONES A L. The use of allele-specific oligonucleotide probes to characterize resistance to benomyl in field strains of *Venturia inaequalis*[J]. *Phytopathology*, 1992, 82(11): 1354-1358.
- [89] 李瑞琴, 刘星, 邱慧珍, 等. 发生马铃薯立枯病土壤中立枯丝核菌的荧光定量 PCR 快速检测[J]. 草业学报, 2013, 22(5): 136-144.
- [90] FILION M, STARNAUD M, JABAJIHARE S H. Quantification of *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* in mycorrhizal bean plants and surrounding mycorrhizosphere soil using real-time polymerase chain reaction and direct isolations on selective media[J]. *Phytopathology*, 2003, 93(2): 229-235.
- [91] FRAAIJE B A, BUTTERS J A, COELHO J M, 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(1): 45-54.
- [92] WHEELER I E, KENDALL S J, BUTTERS J, et al. Using allele - specific oligonucleotide probes to characterize benzimidazole resistance in *Rhynchosporium secalis*[J]. *Pest Management Science*, 2010, 43(3): 201-209.
- [93] ORITA M, SUZUKI Y, SEKIYA T, et al. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction[J]. *Genomics*, 1989, 5(4): 874-879.
- [94] ISHII H, DAVIDSE L C. Decreased binding of carbendazim to cellular protein from *Venturia nashicola* and its involvement in benzimidazole resistance[C].// *Proceeding of the 1986 British Crop Protection Conference-Pests and Disease*, 1986: 1567-1573.
- [95] MALANDRAKIS A A, MARKOGLU A N, ZIOGAS B N. PCR-RFLP detection of the E198A mutation conferring resistance to benzimidazoles in field isolates of *Monilinia laxa* from Greece[J]. *Crop Protection*, 2012, 39(39): 11-17.
- [96] ZIOGAS B N, NIKOU D, MARKOGLU A N, et al. Identification of a novel point mutation in the β -tubulin gene of *Botrytis cinerea*, and detection of benzimidazole resistance by a diagnostic PCR-RFLP assay[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2009, 125(1):97-107.
- [97] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(12): E63.
- [98] NAGAMINE K, WATANABE K, OHTSUKA K, et al. Loop-mediated isothermal amplification reaction using a nondenatured template[J]. *Clinical Chemistry*, 2001, 47(9): 1742-1743.
- [99] 张侃, 蒋菲, 张跃伟, 等. 羟基萘酚蓝在伪狂犬病毒环介导等温扩增检测方法中的应

- 用[J]. 农业生物技术学报, 2011, 19(6): 1075-1080.
- [100] GOTO M, HONDA E, OGURA A, et al. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue[J]. *Biotechniques*, 2009, 46(3): 167-172.
- [101] MORI Y, KITAO M, TOMITA N, et al. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA[J]. *Journal of Biochemical & Biophysical Methods*, 2004, 59(2): 145-157.
- [102] HILL J, BERIWAL S, CHANDRA I, et al. Loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of common strains of *Escherichia coli*[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008, 46(8): 2800-2804.
- [103] SAVAN R, KONO T, ITAMI T, et al. Loop-mediated isothermal amplification: an emerging technology for detection of fish and shellfish pathogens[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2005, 28(10): 573-581.
- [104] IHIRA M, ASANO Y, YOSHIKAWA T, et al. Rapid diagnosis of primary human herpesvirus 6 (HHV-6) infection by loop-mediated isothermal amplification method[J]. *Journal of Clinical Virology*, 2006, 37(1): S102.
- [105] YOSHIKAWA T, IHIRA M, AKIMOTO S, et al. Detection of human herpesvirus 7 DNA by loop-mediated isothermal amplification[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42(3): 1348-1352.
- [106] HONG T C, MAI Q L, CUONG D V, et al. Development and evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of severe acute Respiratory Syndrome Coronavirus[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42(5): 1956-1961.
- [107] POON L L, LEUNG C S, CHAN K H, et al. Detection of human influenza A viruses by loop-mediated isothermal amplification[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43(1): 427-430.
- [108] Notomi T, Mori Y, Tomita N, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects[J]. *Journal of Microbiology*, 2015, 53(1):1-5.
- [109] 孙菲, 鲁少平, 成英, 等. 环介导等温扩增技术研究进展[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2013(6): 417-420.
- [110] 赵伟. 利用环介导等温扩增(LAMP)技术快速检测辣椒疫霉菌[J]. 植物病理学报, 2015(1): 93-96.
- [111] 王贤达, 林雄杰, 胡茜青, 等. 柑橘黄龙病可视化 LAMP 检测技术的建立及应用[J]. 热带作物学报, 2014, 35(5): 918-924.
- [112] DUAN Y B, GE C Y, ZHANG X K, et al. A rapid detection method for the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*, based on loop-mediated isothermal amplification (LAMP)[J]. *Australasian Plant Pathology*, 2014, 43(1):61-66.
- [113] DUAN Y B, GE C Y, ZHANG X K, et al. Development and evaluation of a novel and rapid detection assay for *Botrytis cinerea* based on loop-mediated isothermal amplification[J]. *Plos One*, 2014, 9(10): e111094.
- [114] DUAN Y B, ZHANG X K, Ge C, et al. Development and application of loop-mediated isothermal amplification for detection of the F167Y mutation of carbendazim-resistant isolates in *Fusarium graminearum* [J]. *Scientific Reports*, 2014, 4(4): 7094.
- [115] DUAN Y B, YANG Y, WANG J X, et al. Development and application of loop-mediated isothermal amplification for detecting the highly benzimidazole-resistant isolates in

- Sclerotinia sclerotiorum*[J]. *Scientific Reports*, 2015, (5): 17278.
- [116] MALANDRAKIS A, MARKOGLU A, ZIOGAS B. Molecular characterization of benzimidazole-resistant *B. cinerea* field isolates with reduced or enhanced sensitivity to zoxamide and diethofencarb[J]. *Pesticide Biochemistry & Physiology*, 2011, 99(1): 118-124.
- [117] LIU S, CHE Z, CHEN G. Multiple-fungicide resistance to carbendazim, diethofencarb, procymidone, and pyrimethanil in field isolates of *Botrytis cinerea*, from tomato in Henan Province, China[J]. *Crop Protection*, 2016(84): 56-61.
- [118] ZHANG C Q, LIU Y H, ZHU G N. Detection and characterization of benzimidazole resistance of *Botrytis cinerea* in greenhouse vegetables[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2010, 126(4): 509-515.
- [119] VILLARI C, PEDUTO H F, MAHAFFEE W F, et al. Early detection of airborne inoculum of *Magnaporthe oryzae* in turfgrass fields using a quantitative LAMP assay[J]. *Plant Disease*, 2016, 101(1): 170-177.
- [120] THIESSEN L D, KEUNE J A, NEILL T M, et al. Development of a grower-conducted inoculum detection assay for management of grape powdery mildew[J]. *Plant Pathology*, 2016, 65(2): 238-249.
- [121] DI Y L, LU X M, ZHU Z Q, et al. Time-course of carbendazim stimulation on pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* indicates a direct stimulation mechanism[J]. *Plant Disease*, 2016, 100(7): 1454-1459.
- [122] WHELAN J A, RUSSELL N B, WHELAN M A. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR[J]. *Journal of Immunological Methods*, 2003, 278(1-2): 261-269.
- [123] ZHANG C Q, YUAN S K, SUN H Y, et al. Sensitivity of *Botrytis cinerea* from vegetable greenhouses to boscalid[J]. *Plant Pathology*, 2007, 56(4): 646-653.
- [124] MERTELY J C, MACKENZIE S J, LEGARD D E. Timing of fungicide applications for *Botrytis cinerea* based on development stage of strawberry flowers and fruit[J]. *Plant Disease*, 2007, 86(9): 1019-1024.
- [125] LIN T, XU X F, DAI D J, et al. Differentiation in development of benzimidazole resistance in *Colletotrichum gloeosporioides*, complex populations from strawberry and grape hosts[J]. *Australasian Plant Pathology*, 2016, 45(3): 241-249.
- [126] TOMITA N, MORI Y, KANDA H, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products[J]. *Nature Protocols*, 2008, 3(5): 877-882.
- [127] MARKOGLU A N, MALANDRAKIS A A, VITORATOS A G, et al. Characterization of laboratory mutants of *Botrytis cinerea*, resistant to QoI fungicides[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2006, 115(2): 149-162.
- [128] SHEN W, XU G, SUN L, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and sensitive detection of *Sporisorium scitamineum* in sugarcane[J]. *Annals of Applied Biology*, 2016, 168(3): 321-327.
- [129] VERHOEFF K. Latent infections by fungi[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 1974, 12(1): 99-110.
- [130] DANKS C, BARKER I. On-site detection of plant pathogens using lateral-flow devices[J]. *Eppo Bulletin*, 2000, 30(3-4): 421-426.
- [131] LANE C R, HOBDEN E, WALKER L, et al. Evaluation of a rapid diagnostic field test kit for identification of *Phytophthora* species, including *P. ramorum* and *P. kernoviae* at the point of inspection[J]. *Plant Pathology*, 2007, 56(5): 828-835.

- [132] TOMLINSON J A, DICKINSON M J, BOONHAM N. Rapid detection of *Phytophthora ramorum* and *P. kernoviae* by two-minute DNA extraction followed by isothermal amplification and amplicon detection by generic lateral flow device[J]. *Phytopathology*, 2010, 100(2): 143-149.
- [133] CHOMCZYNSKI P, RYMASZEWSKI M. Alkaline polyethylene glycol-based method for direct PCR from bacteria, eukaryotic tissue samples, and whole blood[J]. *Biotechniques*, 2006, 40(4): 454-458.
- [134] KJD H, GILTRAP P M, BARTON V C, et al. On-site real-time PCR detection of *Phytophthora ramorum* causing dieback of *Parrotia persica* in the UK[J]. *Plant Pathology*, 2006, 55(6): 813-813.
- [135] MERTELY J C, LEGARD D E. Detection, isolation, and pathogenicity of *Colletotrichum* spp. from strawberry petioles[J]. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, 2004, 139(12): 1457-1461.
- [136] YOUNG J R, TOMASOPETERSON M, TREDWAY L P, et al. Occurrence and molecular identification of azoxystrobin-resistant *Colletotrichum cereale* isolates from golf course putting greens in the southern United States[J]. *Plant Disease*, 2010, 94(6): 751-757.
- [137] ISHII H, YANO K, DATE H, et al. Molecular characterization and diagnosis of QoI resistance in cucumber and eggplant fungal pathogens[J]. *Phytopathology*, 2007, 97(11): 1458-1466.
- [138] AVILAADAME C, OLAYA G, KOLLER W. Characterization of *Colletotrichum graminicola* isolates resistant to strobilurin-related QoI fungicides[J]. *Plant Disease*, 2003, 87(12):1426-1432.
- [139] TAO Z Y, ZHOU H Y, XIA H, et al. Adaptation of a visualized loop-mediated isothermal amplification technique for field detection of *Plasmodium vivax* infection[J]. *Parasites & Vectors*, 2011, 4(1): 115.

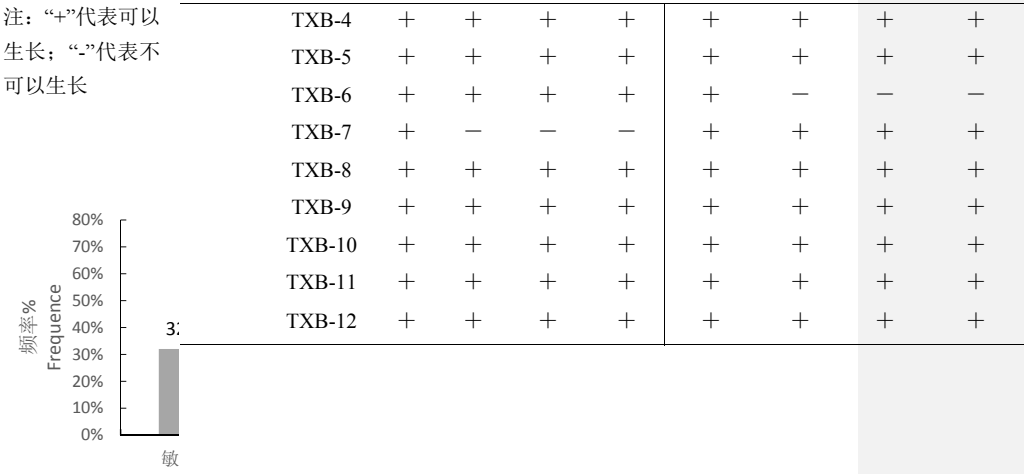
附录

附表 1 灰葡萄孢群体(n=78)对甲基硫菌灵和啉菌酯的抗性检测
Table S1 Detection of resistance to thiophanate-methyl and azoxystrobin

灰葡萄孢对啉菌酯敏感性检测 Detection of resistance to thiophanate-methyl in <i>Botrytis cinerea</i> population						灰葡萄孢对甲基硫菌灵敏感性检测 Detection of resistance to azoxystrobin in <i>Botrytis cinerea</i> population			
地点	菌株编号	0	5	20	100	0 $\mu\text{g/mL}$	5 $\mu\text{g/mL}$	20 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$
Resource	Code	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$				
嘉兴市嘉善县	JSB17-1	+	—	—	—	+	—	—	—
	JSB17-2	+	+	+	+	+	+	+	+
	JSB17-3	+	—	—	—	+	—	—	—
	JSB17-4	+	—	—	—	+	—	—	—
	JSB17-5	+	+	+	+	+	+	+	+
	JSB17-6	+	—	—	—	+	—	—	—
	JSB17-7	+	—	—	—	+	+	+	+
	JSB17-8	+	—	—	—	+	—	—	—
	JSB17-9	+	+	+	+	+	+	+	+
	JSB17-10	+	—	—	—	+	+	+	+
	JSB17-11	+	—	—	—	+	+	+	+
	JSB17-12	+	—	—	—	+	+	+	+
	JSB17-13	+	—	—	—	+	—	—	—
	JSB17-14	+	—	—	—	+	—	—	—
杭州市建德市	JDB17-1	+	—	—	—	+	+	+	+
	JDB17-2	+	+	+	+	+	+	+	+
	JDB17-3	+	—	—	—	+	—	—	—
	JDB17-4	+	—	—	—	+	—	—	—
	JDB17-5	+	+	+	+	+	—	—	—
	JDB17-6	+	+	+	+	+	+	+	+
	JDB17-7	+	+	+	+	+	+	+	+
	JDB17-8	+	—	—	—	+	—	—	—
	JDB17-9	+	—	—	—	+	—	—	—
	JDB17-10	+	+	+	+	+	+	+	+
	JDB17-11	+	+	+	+	+	+	+	+
杭州市下沙区	XSB17-1	+	+	+	+	+	+	+	+
	XSB17-2	+	+	+	+	+	+	+	+

	XSB17-3	+	+	+	+	+	+	+	+
	XSB17-4	+	-	-	-	+	-	-	-
	XSB17-5	+	-	-	-	+	-	-	-
	XSB17-6	+	+	+	+	+	+	+	+
	XSB17-7	+	+	+	+	+	+	+	+
	XSB17-8	+	+	+	+	+	+	+	+
	XSB17-9	+	+	+	+	+	+	+	+
	XSB17-10	+	-	-	-	+	-	-	-
绍兴市诸暨市	ZJB17-1	+	+	+	+	+	+	+	+
	ZJB17-3	+	+	+	+	+	+	+	+
	ZJB17-4	+	+	+	+	+	+	+	+
	ZJB17-6	+	+	+	+	+	+	+	+
	ZJB17-7	+	-	-	-	+	-	-	-
	ZJB17-8	+	+	+	+	+	+	+	+
	ZJB17-9	+	+	+	+	+	+	+	+
	ZJB17-10	+	+	+	+	+	+	+	+
杭州市临安区	LAB17-1	+	-	-	-	+	-	-	-
	LAB17-2	+	-	-	-	+	-	-	-
	LAB17-3	+	-	-	-	+	-	-	-
	LAB17-4	+	-	-	-	+	-	-	-
	LAB17-5	+	-	-	-	+	-	-	-
	LAB17-6	+	-	-	-	+	-	-	-
	PSB-1	+	+	+	+	+	+	+	+
	PSB-2	+	+	+	+	+	+	+	+
	PSB-3	+	+	+	+	+	+	+	+
	PSB-4	+	-	-	-	+	+	+	+
	PSB-5	+	+	+	+	+	+	+	+
	PSB-6	+	+	+	+	+	+	+	+
	PSB-7	+	+	+	+	+	+	+	+
	PSB-8	+	+	+	+	+	+	+	+
	PSB-9	+	+	+	+	+	+	+	+
	PSB-10	+	+	+	+	+	+	+	+
	PSB-11	+	+	+	+	+	+	+	+
	PSB-12	+	-	-	-	+	+	+	+
嘉兴市桐乡市	TXB-1	+	+	+	+	+	+	+	+
	TXB-2	+	+	+	+	+	+	+	+
	TXB-3	+	+	+	+	+	+	+	+

注：“+”代表可以生长；“-”代表不可以生长



附图 1 草莓灰霉病群体 (n=78) 对甲基硫菌灵和啞菌酯的抗性频率
Figure S1 Resistance frequency of populations of *Botrytis cinerea* in strawberry to thiophanate-methyl and azoxystrobin

附表 2 草莓炭疽病菌 (n=93) 对甲基硫菌灵和吡唑醚菌酯的抗性检测
Table S1 Detection of resistance to thiophanate-methyl and pyraclostrobin in *Colletotrichum gloeosporioides* population collected from strawberry

采集地点	草莓炭疽病菌对甲基硫菌灵敏感性检测					草莓炭疽病菌对吡唑醚菌酯敏感性检测			
	Detection of resistance to thiophanate-methyl of <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> population					Detection of resistance to pyraclostrobin of <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> population			
	菌株编号	0μg/mL	5μg/mL	20μg/mL	100μg/mL	0μg/mL	5μg/mL	20μg/mL	100μg/mL

宁波	nbg-2	+	+	+	+	+	-	-	-
	nbg-3	+	+	+	+	+	-	-	-
	nbg-4	+	+	+	+	+	-	-	-
	nbg-5	+	+	+	+	+	-	-	-
	nbg-6	+	+	+	+	+	+	+	+
	nbg-9	+	+	+	+	+	+	+	+
	nbg-12	+	+	+	+	+	+	+	+
	nbg-13	+	+	+	+	+	+	+	+
	nbg-15	+	+	+	+	+	+	+	+
	nbg-17	+	+	+	+	+	+	+	+
	nbg-18	+	+	+	+	+	+	+	+
	nbg-21	+	+	+	+	+	+	+	+
	nbg-23	+	+	+	+	+	-	-	-
	nbg-24	+	+	+	+	+	+	+	+
	nbg-26	+	+	+	+	+	+	+	+
	nbg-27	+	+	+	+	+	+	+	+
	nbg-29	+	+	+	+	+	+	+	+
	nbg-30	+	+	+	+	+	+	+	+
	nbg-31	+	+	+	+	+	+	+	+
	nbg-33	+	+	+	+	+	+	+	+
	nbg-34	+	+	+	+	+	+	+	+
	nbg-38	+	+	+	+	+	+	+	+
	nbg-43	+	+	+	+	+	+	+	+
温州	WZ1-2	+	+	+	+	+	+	+	+
	WZ1-4	+	+	+	+	+	+	+	+
	WZ3-1	+	+	+	+	+	+	+	+
	WZ3-2	+	+	+	+	+	+	+	+
	WZ3-3	+	+	+	+	+	+	+	+
	WZ3-5	+	+	+	+	+	+	+	+
	WZ3-6	+	+	+	+	+	+	+	+
	WZ4-3	+	+	+	+	+	+	+	+
	WZ4-4	+	+	+	+	+	+	+	+
	WZ5-1	+	+	+	+	+	+	+	+
	WZ5-5	+	+	+	+	+	+	+	+
	WZ5-6	+	+	+	+	+	+	+	+
	WZ6-4	+	+	+	+	+	+	+	+

	WZ6-5	+	+	+	+	+	+	+	+
	WZ7-2	+	+	+	+	+	+	+	+
	WZ7-4	+	+	+	+	+	+	+	+
	WZ7-5	+	+	+	+	+	+	+	+
	WZ7-7	+	+	+	+	+	+	+	+
	WZ7-10	+	+	+	+	+	+	+	+
	WZ8-5	+	+	+	+	+	+	+	+
	WZ8-7	+	+	+	+	+	+	+	+
	WZ8-8	+	+	+	+	+	+	+	+
杭州	JGQ-1	+	+	+	+	+	+	+	+
	JGQ-2	+	+	+	+	+	+	+	+
	JGQ-3	+	+	+	+	+	+	+	+
	JGQ-4	+	-	-	-	+	+	+	+
	JGQ-5	+	+	+	+	+	+	+	+
	JGQ-6	+	+	+	+	+	+	+	+
	JGQ-7	+	+	+	+	+	+	+	+
	JGQ-8	+	+	+	+	+	+	+	+
	JGQ-9	+	+	+	+	+	+	+	+
	JGQ-10	+	+	+	+	+	+	+	+
	JGQ-11	+	-	-	-	+	-	-	-
	JGQ-12	+	+	+	+	+	+	+	+
	JGQ-13	+	+	+	+	+	+	+	+
	JGQ-14	+	+	+	+	+	-	-	-
	JGQ-15	+	-	-	-	+	+	+	+
	JGQ-16	+	+	+	+	+	+	+	+
	JGQ-17	+	+	+	+	+	+	+	+
	JGQ-18	+	+	+	+	+	+	+	+
	JGQ-19	+	-	-	-	+	-	-	-
	JGQ-20	+	+	+	+	+	+	+	+
	JGQ-21	+	-	-	-	+	-	-	-
	JGQ-22	+	+	+	+	+	+	+	+
	XSXS-1	+	+	+	+	+	+	+	+
	XSXS-2	+	-	-	-	+	-	-	-
	XSXS-3	+	-	-	-	+	-	-	-
	XSXS-4	+	-	-	-	+	-	-	-
	XSXS-5	+	+	+	+	+	+	+	+

	HJD-1	+	+	+	+	+	-	-	-
	HJD-5	+	+	+	+	+	-	-	-
	HJD-7	+	+	+	+	+	-	-	-
	HJD-12	+	+	+	+	+	-	-	-
	HJD-13	+	+	+	+	+	-	-	-
	HJD-14	+	+	+	+	+	-	-	-
	HJD-16	+	+	+	+	+	+	+	+
	HJD-24	+	+	+	+	+	-	-	-
	HJD-28	+	+	+	+	+	-	-	-
	HJD-33	+	+	+	+	+	-	-	-
	HJD-41	+	+	+	+	+	-	-	-
	HJD-43	+	+	+	+	+	-	-	-
	HJD-46	+	+	+	+	+	-	-	-
	HJD-47	+	+	+	+	+	-	-	-
	HJD-55	+	+	+	+	+	-	-	-
诸暨	HZJ-1	+	-	-	-	+	+	+	+
	HZJ-2	+	+	+	+	+	+	+	+
	HZJ-3	+	+	+	+	+	+	+	+
	HZJ-4	+	-	-	-	+	+	+	+
	HZJ-6	+	+	+	+	+	+	+	+
	HZJ-7	+	-	-	-	+	-	-	-

注：“+”代表可以生长；“-”代表不可以生长

个人简介

胡小然，女，汉族，出生于 1994 年 10 月，安徽滁州人。2015 年毕业于淮阴工学院，获得农学学士学位，并于同年考取浙江农林大学植物保护专业农业推广硕士，主要从事杀菌剂抗药性检测与植物病害治理研究。

研究生期间发表论文：

HU X. R, Dai D. J, Wang H. D and Zhang C. Q. Rapid on-site evaluation of the development of resistance to quinone outside inhibitors in *Botrytis cinerea* [J]. *Scientific Reports*. 2017, 7: DOI:10.1038/s41598-017-13317-z

致谢

时光飞逝，转眼间两年半的研究生生活即将结束，站在毕业的门槛上，回首往昔，奋斗和努力结成丝丝记忆，欢笑和遗憾也都尘埃落定。值此之际，我要向这两年半时间里给予过我帮助和爱护的人们表示最诚挚的谢意。

首先，我要特别感谢我的导师张传清教授，本论文是在导师的悉心指导之下完成的，导师以他渊博的专业知识，严谨的科研态度，精益求精的工作作风，诲人不倦的高尚师德，朴实无华、平易近人的人格魅力深深影响和鼓励着我。本论文从选题到完成，每一步都是在导师的指导下完成的，倾注了导师大量的心血，在此我向我的导师表示深切的谢意与祝福。

其次，我要感谢本课题组的每一个老师，他们在我研究生课题完成过程中，对我遇到的问题一一解答，在这里要感谢时浩杰副教授、吴鉴艳老师、李玲老师、张宇老师，感谢徐志宏教授、张大羽教授、吴慧明副教授、潘程远副教授、尹晓辉副教授、饶琼副教授、周国鑫副教授、邓建宇副教授等植保学科任课老师对我的教诲。感谢浙江农林大学及植保学科给予我良好的科研条件和学习环境。

再次，要谢谢我的同学们和师弟们在我两年多研究生生活中给予的关心和帮助，感谢林婷师姐在我刚入校时给予我的指导。

最后，要感谢我的家人对我的爱护与支持，一如既往地支持我、鼓励我。