

禾谷镰刀菌 *CYP51A* 基因对五种三唑类杀菌剂敏感性的影响

钱恒伟 迟梦宇 赵颖 赵彦翔 黄金光*

(青岛农业大学植物医学学院, 山东省植物病虫害综合防控重点实验室, 青岛 266109)

摘要: 为进一步明确 14 α -脱甲基酶编码基因 *CYP51A* 在禾谷镰刀菌 *Fusarium graminearum* 对三唑类杀菌剂敏感性中的作用, 利用 Split-marker 方法敲除禾谷镰刀菌 *CYP51A* 基因并获得敲除 *CYP51A* 基因的禾谷镰刀菌 $\Delta FgCYP51A$ 菌株, 比较该菌株和野生型菌株 PH-1 对 5 种三唑类杀菌剂的敏感性变化。结果表明, $\Delta FgCYP51A$ 菌株对丙环唑、戊唑醇、烯唑醇、三唑醇和三唑酮的 EC_{50} 分别为 0.024、0.047、0.148、0.154 和 0.474 mg/L。 $\Delta FgCYP51A$ 菌株对戊唑醇、三唑醇、三唑酮和丙环唑的敏感性均显著增加, 而对烯唑醇的敏感性无明显变化。表明 *FgCYP51A* 基因与禾谷镰刀菌对三唑类杀菌剂的敏感性有关。

关键词: 禾谷镰刀菌; *CYP51A* 基因; 三唑类杀菌剂; 敏感性; 抑制中浓度

Effect of *CYP51A* gene of *Fusarium graminearum* on sensitivity to five triazole fungicides

Qian Hengwei Chi Mengyu Zhao Ying Zhao Yanxiang Huang Jinguang*

(Key Laboratory of Integrated Crop Disease and Pest Management of Shandong Province, College of Plant Health and Medicine, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, Shandong Province, China)

Abstract: To understand the function of 14 α -demethylation encoding gene *CYP51A* on the sensitivity to triazole fungicides, the Split-marker approach was used to generate the *FgCYP51A* gene deletion mutant, which was named as the $\Delta FgCYP51A$ strain, and the sensitivity was investigated and compared between $\Delta FgCYP51A$ strain and wide type strain PH-1. The results showed that the EC_{50} of $\Delta FgCYP51A$ strain to propiconazole, tebuconazole, diniconazole, triadimenol and triadimefon were 0.024, 0.047, 0.148, 0.154 and 0.474 mg/L, respectively. The sensitivity of $\Delta FgCYP51A$ strain to tebuconazole, triadimenol, triadimefon and propiconazole increased significantly compared to the PH-1 strain, but the diniconazole had no significant change. This research proved that the *FgCYP51A* gene was sensitive to triazole fungicide.

Key words: *Fusarium graminearum*; *CYP51A* gene; triazole fungicides; sensitivity; EC_{50}

小麦赤霉病是由镰刀菌属真菌 *Fusarium* spp. 引起的一种世界性病害, 也是我国小麦生产中的主要病害, 其中禾谷镰刀菌 *F. graminearum* 是其主要的病原菌。小麦赤霉病不仅使小麦产量降低, 其病原菌产生的真菌毒素还危害人畜健康, 生产上对该

病害的防治主要使用化学杀菌剂 (Parry et al., 1995; Xu & Niholsonc, 2009)。20 世纪 70 年代以来, 苯并咪唑类杀菌剂多菌灵被用于防治小麦赤霉病。苯并咪唑类杀菌剂为 β -微管蛋白 (β -tubulin) 抑制剂, 主要通过与其微管蛋白结合来抑制细胞纺锤丝的

形成,影响细胞的有丝分裂,从而达到杀菌效果(Yuan & Zhou, 2005)。由于该类药剂作用位点单一,并且长期使用已经使病原菌产生抗药性(Chen et al., 2007)。研究表明,禾谷镰刀菌对多菌灵的抗药性主要是因为 β_2 -tubulin的点突变,且不同突变位点引起的抗性水平存在一定的差异(Chen et al., 2009; Qiu et al., 2011)。三唑类杀菌剂是甾醇脱甲基抑制剂中的一类,主要有戊唑醇、三唑酮和三唑醇等(Yin et al., 2009)。该类药剂作用于甾醇生物合成途径中的14 α -脱甲基酶(sterol 14 α -demethylase),使真菌中麦角甾醇的生物合成受阻,破坏细胞膜功能,从而抑制病原菌的生长,因此又称为甾醇脱甲基化抑制剂(sterol demethylase inhibitors, DMIs)(Siegel, 1981)。由于其独特的作用方式以及较好的防效,目前逐渐成为防治小麦赤霉病的主要药剂。

禾谷镰刀菌含有3个CYP51基因,分别是FgCYP51A、FgCYP51B和FgCYP51C,虽然其编码的氨基酸序列的同源性较高,但生物学功能却完全不同。FgCYP51B基因编码的蛋白是最主要的功能性甾醇14 α -脱甲基酶,该基因也是子囊孢子形成的必需基因;FgCYP51A是一个可诱导表达基因,与病原菌对三唑类杀菌剂的敏感性密切相关;FgCYP51C基因则不参与编码甾醇14 α -脱甲基酶,主要与病原菌的致病性有关,但与杀菌剂的敏感性无关(Fan et al., 2013)。Fan et al. (2013)研究结果表明, Δ FgCYP51A菌株对7种唑类杀菌剂的敏感性均增加,这与Liu et al. (2011)的研究结果一致。稻瘟菌 *Magnaporthe oryzae* 的CYP51A基因被敲除后,其对多种唑类杀菌剂高度敏感,进一步说明CYP51A基因在稻瘟菌对唑类杀菌剂的敏感性中发挥着重要作用(Yan et al., 2011)。

关于小麦赤霉病防治药效的研究较多,但针对不同靶点进行药效分析的研究较少。Liu et al. (2011)和Fan et al. (2013)研究结果表明,不同的三唑类杀菌剂作用不同的禾谷镰刀菌CYP51基因;Qian et al. (2018)对FgCYP51B靶标蛋白三维结构及其与三唑类杀菌剂精细互作进行了深入研究,发现FgCYP51B蛋白与戊唑醇、丙环唑的亲合力较强,而与三唑醇、三唑酮、烯唑醇的亲合力较弱。为探究CYP51A基因在三唑类杀菌剂对禾谷镰刀菌的生物活性中的作用,以及筛选出对 Δ FgCYP51A菌株敏感的药剂。本研究通过将CYP51A基因敲除,得到缺失突变体 Δ FgCYP51A菌株,然后测定其对5种三唑类杀菌剂的敏感性,以期田间防治小麦赤霉病

提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株:禾谷镰刀菌野生型菌株PH-1由中国农业科学院植物保护研究所范洁茹博士惠赠。

培养基:马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基:去皮马铃薯200 g、葡萄糖20 g、琼脂糖15 g、蒸馏水1 L;马铃薯葡萄糖肉汤(potato dextrose broth, PDB)培养基:去皮马铃薯200 g、葡萄糖20 g、蒸馏水1 L;潮霉素培养基:含100 μ g/mL潮霉素的PDA培养基;绿豆汤培养基:30 g绿豆加入到800 mL水中煮沸10 min,定容到1 000 mL,高温灭菌;酵母蛋白胨蔗糖(yeast extract peptone dextrose, YPS)培养基:酵母提取物3 g、细菌蛋白胨3 g、蔗糖200 g溶于800 mL水中,充分搅拌,定容到1 L,高温灭菌;再生培养基:40 g酵母提取物、40 g酪蛋白水解物溶于800 mL水中,充分溶解,定容至1 L。

试剂及药剂:溴化十六烷三甲基铵(cetyltrimethyl ammonium bromide, CTAB)、潮霉素、核酸染料,北京索莱宝生物技术有限公司;LA Taq、Taq PCR Master Mix、DL2000 DNA Marker, 宝生物工程(大连)有限公司;PCR产物纯化试剂盒、DNA片段快速回收试剂盒、质粒快速提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;其它试剂均为国产分析纯。96%三唑类杀菌剂烯唑醇(diniconazole)可湿性粉剂、96%三唑酮(triadimefon)乳油、96%三唑醇(triadimenol)可湿性粉剂、98%戊唑醇(tebuconazole)可湿性粉剂和97%丙环唑(propiconazole)乳油,德国巴斯夫股份有限公司。

仪器:GXZ-280B光照培养箱,宁波东南仪器有限公司;960型Heal Force基因扩增仪,杭州晶格科学仪器有限公司;CX22LED RFS1显微镜,日本Olympus公司。

1.2 方法

1.2.1 禾谷镰刀菌基因组DNA提取

将禾谷镰刀菌菌株PH-1接种到PDA培养基上,置于25 $^{\circ}$ C培养箱中黑暗培养4 d,待菌丝长满平板采用CTAB法提取基因组DNA(孙立夫等, 2009; 何宛芹等, 2017)。收集菌丝,液氮研磨成粉末,取100 mg粉末至1.5 mL离心管中;加入200 μ L 2% CTAB抽提液,将离心管置于65 $^{\circ}$ C水浴槽中水浴加热1 h;取出离心管,放至室温,加入等体积的氯仿,剧烈振荡,室温静置2 min, 12 000 r/min离心15 min,

重复2次;取上清液至1.5 mL离心管中,加入等体积的异丙醇,将离心管慢慢上下摇动使其与水层充分混合至絮状物出现,-20℃放置20 min;常温下以12 000 r/min离心15 min,使DNA沉淀,弃上清液,用70%乙醇洗涤沉淀,室温下以7 500 r/min离心5 min,弃上清液,室温下晾干DNA;加入30~50 μL的灭菌水溶解DNA沉淀,置于-20℃保存。

1.2.2 禾谷镰刀菌*FgCYP51A*基因敲除方法

采用聚乙二醇(polyethylene glyco, PEG)介导的原生质体转化 Split-marker PCR 片段法(Catlett et al., 2003; Hou et al., 2013)对禾谷镰刀菌 *FgCYP51A* 基因进行敲除。将扩增获得的带有潮霉素标签的混合片段转化到禾谷镰刀菌菌株 PH-1 制备

的原生质中。PCR 分2轮进行扩增反应。第1轮PCR以禾谷镰刀菌菌株 PH-1 基因组 DNA 为模板,其中引物 M13R 和 HY 扩增潮霉素基因的 5' 片段(HY),目的序列长度为1 274 bp;引物 YG 和 M13F 扩增潮霉素基因的 3' 片段(YG),目的序列长度为883 bp;引物 AF1 和 AR1 扩增 *CYP51A* 基因上游片段(A-5),目的序列长度为882 bp;引物 AF2 和 AR2 扩增 *CYP51A* 基因下游片段(A-3),目的序列长度为954 bp。第2轮为2次融合PCR,以HY与A-5片段为模板,用引物 AF1 与 HY 进行扩增;以 YG 与 A-3 片段为模板,用引物 YG 与 AR2 进行扩增,2条融合PCR产物经过纯化(杜瑞晓等,2015)后用于原生质体转化,PCR 扩增引物如表1所示。

表 1 禾谷镰刀菌 *CYP51A* 基因敲除的引物
Table 1 Primers used for deletion of *FgCYP51A* gene of *Fusarium graminearum*

引物Primer	序列(5'-3') Sequence	备注 Note
AF1	TCGGTCAGGATGGTCTCTGG	扩增 <i>FgCYP51A</i> 基因5'端序列片段 Amplification of 5' flank of <i>FgCYP51A</i>
AR1	TCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTGAA-GGCAACTACTCAAGCAGGG	
AF2	GTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTG-AGAGTCAAGTTGTGTTAGCATCC	扩增 <i>FgCYP51A</i> 基因3'端序列片段 Amplification of 3' flank of <i>FgCYP51A</i>
AR2	GAGTCCGCTGTCTCCATAGACC	
M13F	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC	分裂标记 Split marker
M13R	AGCGGATAACAATTTACACAGGA	分裂标记 Split marker
A-F	ATGTTCCATCTACTCATCTATCCCTTAT	<i>FgCYP51A</i> 基因鉴定
A-R	CTATATCTTCTTCCTACGCTCCCATCGA	Confirming PCR of <i>FgCYP51A</i> gene
HY	GGATGCCTCCGCTCGAAGTA	扩增 <i>HYG</i> 基因5'序列片段 Amplification of 5' flank of <i>HYG</i> gene
YG	CGTTGCAAGACCTGCCTGAA	扩增 <i>HYG</i> 基因3'序列片段 Amplification of 3' flank of <i>HYG</i> gene
GC1	ACTTCTCGACAGACGTCGC	敲除体PCR验证
GC2	TGGCTGTGTAGAAGTACTCG	Confirming PCR of gene deletion mutants
A-5 out F	GATTTCATACCAGGTCAC	<i>FgCYP51A</i> 基因敲除体PCR验证
A-3 out R	ACCTTCCAACCGTGCTG	Confirming PCR of <i>FgCYP51A</i> deletion mutant

1.2.3 原生质体制备与转化

将禾谷镰刀菌菌株 PH-1 菌丝块接种于PDA培养基上,密封后黑暗培养,25℃培养3 d。取菌落边缘菌饼于绿豆汤培养基中,每瓶6个菌饼,25℃下以200 r/min振摇培养24 h;过滤收集分生孢子并接种于400 mL YPS培养基中,使孢子量至少为10⁸个,16℃下以160 r/min振摇培养12 h;收集菌丝,并用0.7 mol/L NaCl溶液冲洗,将菌丝重新悬浮于40 mL酶解液中,31℃下以90 r/min振摇培养,酶解2 h;将酶解后的原生质体混合液4 000 r/min离心10 min,弃上清液,收集原生质体。原生质体用1 mL的STC缓冲液重新悬浮,并转置1.5 mL离心管中以5 000 r/min离心2 min,弃上清液,重复1次。将原生质体于10 mL

的STC缓冲液中重新悬浮,室温下镜检其浓度。将10 μL混合PCR产物加入到200 μL原生质体悬浮液中轻轻混匀,室温下放置20 min;轻轻加入1 mL 40% PEG 8 000小心充分混匀,室温下放置20 min;加入20 mL再生培养基,室温振荡过夜培养使原生质体再生。将转化液加入到PDA培养基中,加入终浓度为100 μg/mL的潮霉素,25℃下黑暗培养3~4 d后挑取转化子(侯毅平等,2013)。

1.2.4 转化子的PCR鉴定

提取能在含100 μg/mL潮霉素的PDA培养基上正常生长的转化子基因组DNA,利用多重PCR方法对其进行转化子鉴定。采用A-5 out F和GC1、GC2和A-3 out R、*FgCYP51A* 基因特异性引物A-F

和 A-R 对 *FgCYP51A* 基因进行 PCR 扩增, 以确保 *FgCYP51A* 基因与 Marker 完全发生同源重组被取代。根据 PCR 产物的大小判断插入位置是否正确, 以野生型菌株 PH-1 作对照设计 DNA 探针, 对 PCR 验证正确的 *FgCYP51A* 基因敲除转化子进行 Southern blot 验证 (Bluhm et al., 2007; 王光辉, 2010)。将鉴定正确的转化子命名为 $\Delta FgCYP51A$ 菌株, 即获得敲除 *FgCYP51A* 基因的菌株。

1.2.5 禾谷镰刀菌菌株对杀菌剂的敏感性测定

采用菌丝生长速率法测定禾谷镰刀菌 $\Delta FgCYP51A$ 菌株对 5 种三唑类杀菌剂的敏感性。用二甲亚砜将戊唑醇、三唑酮、三唑醇、丙环唑、烯唑醇分别配制成浓度为 100、400、100、25 和 50 mg/L 的母液, 分别取每种药剂的 0、15、30、62.5、125、250、500 μ L 加入到 50 mL 的 PDA 培养基中, 使得戊唑醇的工作浓度分别为 0、0.030、0.060、0.125、0.250、0.500、1.000 mg/L, 三唑酮的工作浓度分别为 0、0.125、0.250、0.500、1.000、2.000、4.000 mg/L, 三唑醇的工作浓度分别为 0、0.030、0.060、0.125、0.250、0.500、1.000 mg/L, 丙环唑的工作浓度分别为 0、0.008、0.016、0.031、0.063、0.125、0.250 mg/L, 烯唑醇的工作浓度分别为 0、0.016、0.031、0.063、0.125、0.250、0.500 mg/L。将在不含药的 PDA 培养基中培养 3 d 的禾谷镰刀菌菌落打取直径为 6 mm 的菌饼, 将菌饼接种于含不同药剂浓度的 PDA 培养基上, 每个药剂浓度设置 3 次重复, 以不含药的 PDA 培养基为对照, 将菌落置于 25℃ 恒温培养箱中培养, 72 h 后以十字交叉法测量菌落直径, 根据公式计算生长抑制率 (王晓坤等, 2017)。菌丝生长抑制率 = (对照菌落直径 - 处理菌落直径) / (对照菌落直径 - 菌饼直径) $\times$ 100%。禾谷镰刀菌 PH-1 菌株对 5 种三唑类杀菌剂敏感性测定采用同样的方法。

1.2.6 禾谷镰刀菌菌株对杀菌剂的 EC_{50}

运用 Excel 2007 软件对菌丝生长抑制率数据进行处理, 得到毒力回归曲线方程 $y=a+bx$ 并计算抑制中浓度 EC_{50} 与相关系数 (Li et al., 2014; 唐爽爽等, 2014)。

1.3 数据分析

利用 SPSS 16.0 软件对数据进行统计分析, 采用 *t* 检验法对数据进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 $\Delta FgCYP51A$ 菌株的鉴定结果

在 *FgCYP51A* 基因敲除转化子 $\Delta A-8$ 与 $\Delta A-9$ 中

扩增到 1 条约 1 500 bp 的 *HYG* 基因 5' 序列片段 (5 out) 和 1 条 1 200 bp 的 *HYG* 基因 3' 序列片段 (3 out) 条带, 在野生型菌株 PH-1 中未检测到这 2 条带, 根据 PCR 条带的大小判断潮霉素插入位置正确; 在 *FgCYP51A* 基因敲除转化子 $\Delta A-8$ 与 $\Delta A-9$ 中未检测到 *FgCYP51A* 基因片段, 而野生型菌株 PH-1 中扩增到 *FgCYP51A* 片段, 说明 *FgCYP51A* 基因敲除转化子 $\Delta A-8$ 与 $\Delta A-9$ 中的 *FgCYP51A* 基因被完全替换 (图 1)。

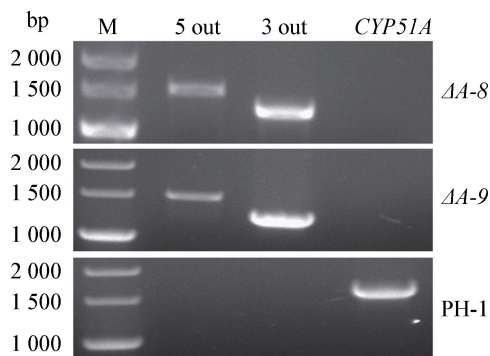


图 1 *FgCYP51A* 基因敲除转化子的 PCR 鉴定

Fig. 1 *FgCYP51A* gene deletion confirmation by PCR products

M: DNA marker; PH-1: 野生型菌株; 5 out: *HYG* 基因 5' 序列片段; 3 out: *HYG* 基因 3' 序列片段; $\Delta A-8$ 、 $\Delta A-9$: *FgCYP51A* 基因敲除菌株。M: DNA marker; PH-1: wide type strain; 5 out: 5' flank of *HYG* gene; 3 out: 3' flank of *HYG* gene; $\Delta A-8$, $\Delta A-9$: *FgCYP51A* gene deletion mutant strains.

Southern blot 验证结果显示, 野生型菌株 PH-1 验证出 1 条 2.1 kb 的条带, 敲除体菌株 $\Delta A-8$ 与 $\Delta A-9$ 验证出 1 条 3.2 kb 的条带, 与预期结果一致, 说明鉴定的转化子 $\Delta A-8$ 与 $\Delta A-9$ 均为正确的 *FgCYP51A* 基因敲除转化子 (图 2)。

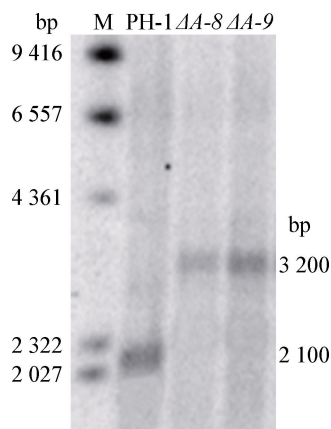


图 2 *FgCYP51A* 基因敲除转化子的 Southern blot 鉴定

Fig. 2 *FgCYP51A* gene deletion confirmation by Southern blot

M: DNA marker; PH-1: 野生型菌株; $\Delta A-8$ 、 $\Delta A-9$: *FgCYP51A* 基因敲除菌株。M: DNA marker; PH-1: wide type strain; $\Delta A-8$, $\Delta A-9$: *FgCYP51A* gene deletion mutant strains.

2.2 禾谷镰刀菌株对杀菌剂的敏感性

$\Delta FgCYP51A$ 菌株在含 0、0.030、0.060、0.125、0.250、0.500、1.000 mg/L 戊唑醇的 PDA 培养基上的菌丝生长抑制率分别为 0%、56.0%、76.0%、82.3%、91.3%、95.4%、96.4%；在含 0、0.125、0.250、0.500、1.000、2.000、4.000 mg/L 三唑酮的 PDA 培养基上的菌丝生长抑制率分别为 0%、14.7%、26.8%、57.2%、74.9%、86.2%、92.1%；在含 0、0.030、0.060、0.125、0.250、0.500、1.000 mg/L 三唑醇的 PDA 培养基上的菌

丝生长抑制率分别为 0%、4.0%、14.4%、54.2%、70.0%、86.9%、92.4%；在含 0、0.008、0.016、0.031、0.063、0.125、0.250 mg/L 丙环唑的 PDA 培养基上的菌丝生长抑制率分别为 0%、20.5%、42.4%、60.7%、70.9%、81.7%、91.2%；在含 0、0.016、0.031、0.063、0.125、0.250、0.500 mg/L 烯唑醇的 PDA 培养基上的菌丝生长抑制率分别为 0%、9.8%、14.2%、24.3%、51.2%、64.0%、76.2% (图 3)。

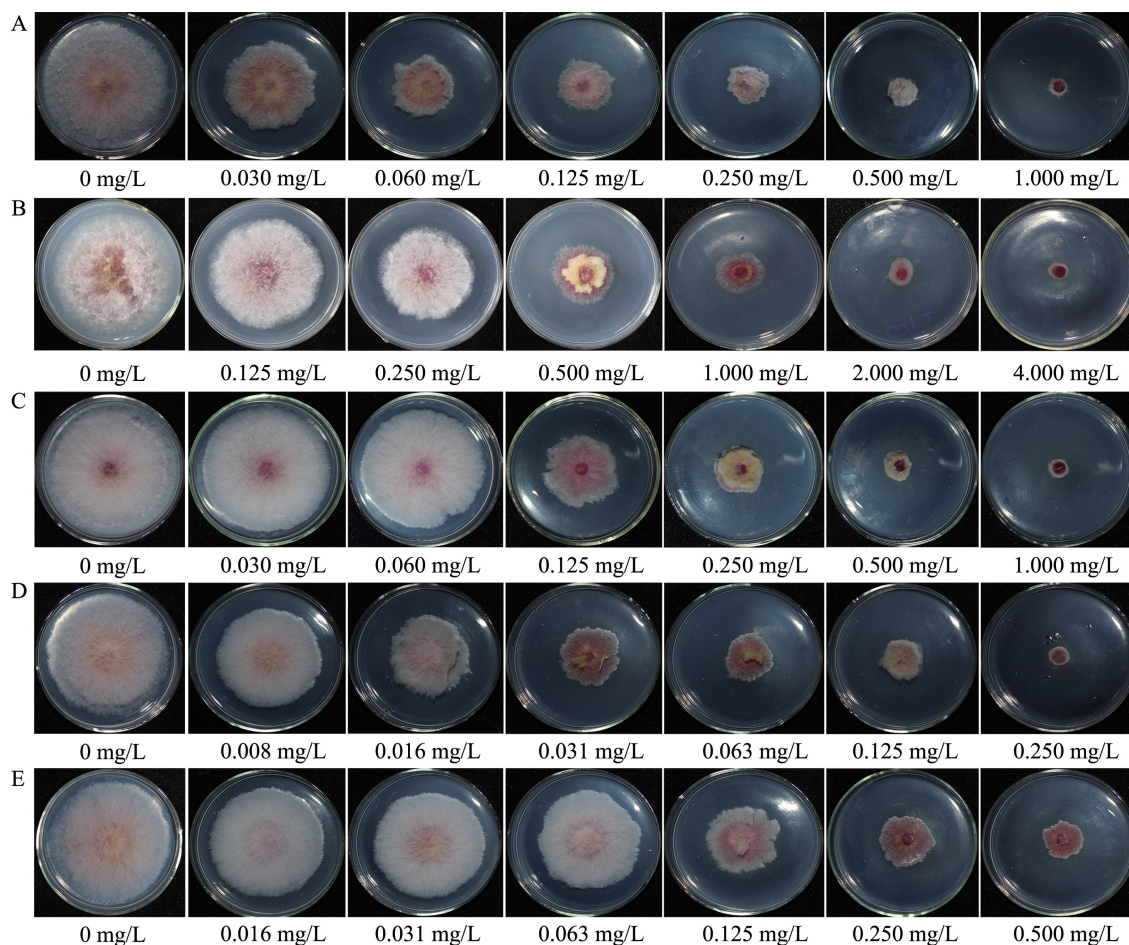


图 3 禾谷镰刀菌 $\Delta FgCYP51A$ 菌株对不同浓度 5 种三唑类药剂的敏感性

Fig. 3 Sensitivity of five azole fungicides with different concentrations on mycelium growth of

Fusarium graminearum $\Delta FgCYP51A$ strain

A~E: 戊唑醇、三唑酮、三唑醇、丙环唑、烯唑醇。A~E: Tebuconazole, triadimefon, triadimenol, propiconazole, diniconazole.

野生型菌株 PH-1 在含 0、0.063、0.125、0.250、0.500、1.000、2.000 mg/L 戊唑醇的 PDA 培养基上的菌丝生长抑制率分别为 0%、38.7%、60.4%、71.2%、79.3%、86.9%、93.9%；在含 0、0.500、1.000、2.000、4.000、8.000、16.000 mg/L 三唑酮的 PDA 培养基上的菌丝生长抑制率分别为 0%、4.3%、11.2%、21.1%、45.6%、59.4%、64.5%；在含 0、0.125、0.250、0.500、1.000、2.000、4.000 mg/L 三唑醇的 PDA 培养基上的菌

丝生长抑制率分别为 0%、12.3%、13.2%、19.6%、32.0%、44.6%、68.9%；在含 0、0.013、0.025、0.050、0.100、0.200、0.400 mg/L 丙环唑的 PDA 培养基上的菌丝生长抑制率分别为 0%、8.8%、17.6%、25.4%、39.3%、58.0%、73.9%；在含 0、0.013、0.025、0.050、0.100、0.200、0.400 mg/L 烯唑醇的 PDA 培养基上的菌丝生长抑制率分别为 0%、5.3%、20.9%、28.5%、39.7%、57.2%、69.8% (图 4)。

对比禾谷镰刀菌野生型菌株 PH-1 与 *FgCYP51A* 基因敲除菌株 $\Delta FgCYP51A$ 在相同含药 PDA 培养基上的菌落直径大小,禾谷镰刀菌 *FgCYP51A* 基因敲除后对戊唑醇、三唑醇、三唑酮和丙环唑的敏感性显著增加($P<0.05$),而对烯唑醇无明显变化,表明禾谷镰刀菌对戊唑醇、三唑醇、三唑酮和丙环唑的敏感性与 *FgCYP51A* 基因紧密相关,而禾谷镰刀菌对烯唑醇的敏感性与 *FgCYP51A* 基因无相关性。

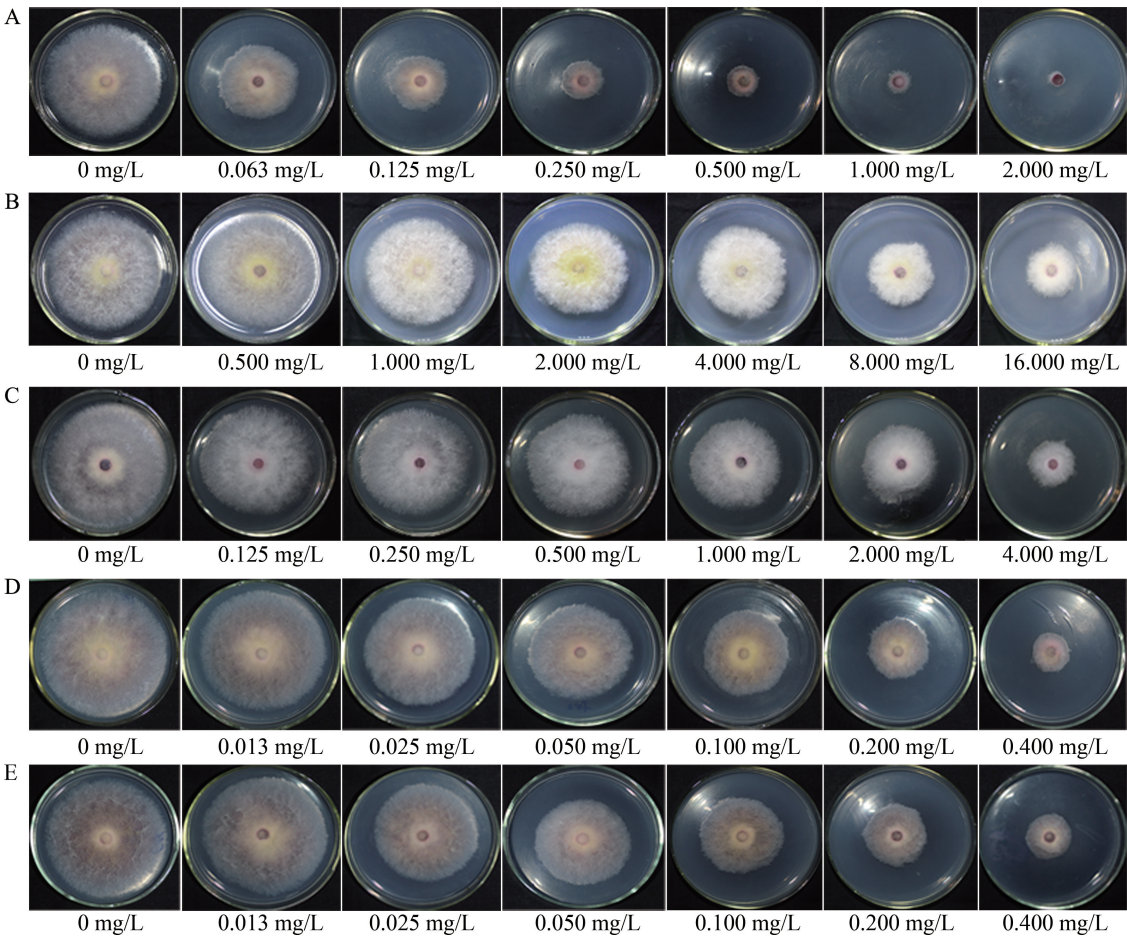


图4 禾谷镰刀菌 PH-1 菌株对不同浓度 5 种三唑类药剂的敏感性
Fig. 4 Sensitivity of five azole fungicides with different concentrations on mycelium growth of *Fusarium graminearum* PH-1 strain
A~E: 戊唑醇、三唑酮、三唑醇、丙环唑、烯唑醇。A~E: Tebuconazole, triadimefon, triadimenol, propiconazole, diniconazole.

2.3 禾谷镰刀菌菌株对杀菌剂的EC₅₀
 $\Delta FgCYP51A$ 菌株对戊唑醇、三唑酮、三唑醇、丙
环唑和烯唑醇的 EC₅₀ 分别是 0.047、0.474、0.154、
0.024 和 0.148 mg/L, PH-1 菌株对戊唑醇、三唑酮、三
唑醇、丙环唑与烯唑醇的 EC₅₀ 分别是 0.092、6.513、
0.956、0.143 和 0.166 mg/L (表 2)。

表2 5种三唑类杀菌剂对禾谷镰刀菌 $\Delta FgCYP51A$ 和 PH-1 菌株菌丝生长的抑制作用
Table 2 Toxicity of five azole fungicides to mycelia growth of *Fusarium graminearum* $\Delta FgCYP51A$ and PH-1 strains

菌株 Strain	药剂 Fungicide	毒力回归方程 Toxicity regression equation	相关系数 Related coefficient	EC ₅₀ (mg/L)
$\Delta FgCYP51A$	戊唑醇 Tebuconazole	$y=1.51+0.78x$	0.975	0.047
	三唑酮 Triadimefon	$y=0.54+1.70x$	0.991	0.474
	三唑醇 Triadimenol	$y=1.70+2.17x$	0.981	0.154
	丙环唑 Propiconazole	$y=2.20+1.37x$	0.992	0.024
	烯唑醇 Diniconazole	$y=1.12+1.36x$	0.990	0.148
PH-1	戊唑醇 Tebuconazole	$y=1.18+1.14x$	0.993	0.092
	三唑酮 Triadimefon	$y=-1.20+1.47x$	0.987	6.513
	三唑醇 Triadimenol	$y=-0.34+1.19x$	0.956	0.956
	丙环唑 Propiconazole	$y=1.10+1.30x$	0.998	0.143
	烯唑醇 Diniconazole	$y=0.92+1.20x$	0.959	0.166

3 讨论

Liu et al. (2011) 和 Fan et al. (2013) 均通过试验证明 *FgCYP51A* 基因与病原菌对唑类杀菌剂敏感性的关系, 前者认为 *FgCYP51B* 基因与病原菌对唑类杀菌剂的敏感性无关, 但后者试验结果表明 *FgCYP51B* 基因与病原菌对部分唑类杀菌剂的敏感性有关。本研究发现禾谷镰刀菌 $\Delta FgCYP51A$ 菌株对戊唑醇、三唑醇、三唑酮和丙环唑三唑类杀菌剂的敏感性显著增加, 而对烯唑醇的敏感性无明显变化; 但 $\Delta FgCYP51A$ 菌株对 5 种三唑类杀菌剂的敏感性无显著差异 (数据未发表), 这与 Liu et al. (2011) 的研究结果一致。在含多个 *CYP51* 基因的真菌中, *CYP51A* 基因一般与其对唑类杀菌剂的敏感性有关, 通过基因敲除发现烟曲霉 *Aspergillus fumigatus* 对氟康唑的固有敏感性与 *AfCYP51A* 基因有关 (Mellado et al., 2005); 稻瘟菌 *MoCYP51A* 基因与该菌对唑类杀菌剂的敏感性有关, 而 *MoCYP51B* 基因敲除后对该类杀菌剂的敏感性无显著变化 (闫霞, 2012)。Sun et al. (2011) 研究发现指状青霉菌 *Penicillium digitatum* *PdCYP51B* 基因与菌株对抑霉唑的抗药性密切相关。另外, 三唑类杀菌剂可以解决苯并咪唑类杀菌剂带来的抗药性问题 (Luo et al., 2009; Hou et al., 2013), 还可以减少染病麦粒中真菌毒素的含量。

根据 $\Delta FgCYP51A$ 菌株对不同三唑类杀菌剂敏感性的差异, 将 5 种三唑类杀菌剂分为 2 类, 第 1 类包括戊唑醇、三唑醇、三唑酮和丙环唑; 第 2 类为烯唑醇。生产上可以尝试将烯唑醇与戊唑醇或者其它 DMIs 类杀菌剂混配来防治小麦赤霉病; 除此之外, 可以进一步筛选出对 *FgCYP51B* 基因敲除菌株敏感性的三唑类杀菌剂, 并将其与不同的唑类杀菌剂混配, 提高防效, 降低或延迟抗药性的发生。本实验室前期研究发现, *FgCYP51B* 与戊唑醇、丙环唑的亲合力较强, 而与三唑醇、三唑酮、烯唑醇的亲合力较弱 (Qian et al., 2018), 本研究结果进一步佐证了前期的研究结论。下一步工作将对 *FgCYP51A* 基因进行定点突变, 探究与三唑类杀菌剂互作中发挥作用的氨基酸位点, 解析禾谷镰刀菌对三唑类杀菌剂的抗性机制, 筛选高活性的杀菌剂, 以期小麦赤霉病的田间防治提供理论支持。

致谢: 中国农业科学院植物保护研究所范洁茹博士提供菌株 PH-1 并对基因敲除试验方法提供了指导, 特此致谢!

参 考 文 献 (References)

- Bluhm BH, Zhao X, Flaherty JE, Xu JR, Dunkle LD. 2007. RAS2 regulates growth and pathogenesis in *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(6): 627–636
- Catlett NL, Lee BN, Yoder OC, Turgeon BG. 2003. Split-marker recombination for efficient targeted deletion of fungal genes. *Fungal Genetics Newsletter*, 50(31): 9–11
- Chen CJ, Wang JX, Luo QQ, Yuan SK, Zhou MG. 2007. Characterization and fitness of carbendazim-resistant strains of *Fusarium graminearum* (wheat scab). *Pest Management Science*, 63(12): 1201–1207
- Chen CJ, Yu JJ, Bi CW, Zhang YN, Xu JQ, Wang JX, Zhou MG. 2009. Mutations in a β -tubulin confer resistance of *Gibberella zeae* to benzimidazole fungicides. *Phytopathology*, 99(12): 1403–1411
- Du RX, Zhang LL, Chen N, Shen LB, Zhang TY, Lü HS, Ma LQ, Yang MF. 2015. A simple and efficient DNA purification method. *Journal of Beijing University of Agriculture*, 30(4): 29–32 (in Chinese) [杜瑞晓, 张璐璐, 陈楠, 沈利斌, 张天宇, 吕鹤书, 马兰青, 杨明峰. 2015. 一种简便有效的核酸纯化方法. 北京农学院学报, 30(4): 29–32]
- Fan JR, Urban M, Parker JE, Brewer HC, Kelly SL, Hammond-Kosack KE, Fraaije BA, Liu X, Cools HJ. 2013. Characterization of the sterol 14 α -demethylases of *Fusarium graminearum* identifies a novel genus-specific CYP51 function in wheat infection. *New Phytologist*, 198(3): 821–835
- He WQ, Fu Y, Lu WL, Chang XL, Yang WY. 2017. A multiplex PCR detection technique for the pathogenic *Fusarium* species causing soybean root rot. *Journal of Plant Protection*, 44(4): 609–616 (in Chinese) [何宛芹, 付瑶, 鲁雯璐, 常小丽, 杨文钰. 2017. 大豆根腐病致病镰孢菌的多重 PCR 检测技术. 植物保护学报, 44(4): 609–616]
- Hou YP, Gao T, Zheng ZT, Chen CJ, Zhou MG. 2013. An economic and highly efficient system of protoplast transformation for *Fusarium graminearum*. *Mycosystema*, 32(5): 891–898 (in Chinese) [侯毅平, 高弢, 郑志天, 陈长军, 周明国. 2013. 一种经济高效的禾谷镰孢菌原生质体转化方法. 菌物学报, 32(5): 891–898]
- Hou YP, Luo QQ, Chen CJ, Zhou MG. 2013. Application of tetra primer ARMS-PCR approach for detection of *Fusarium graminearum* genotypes with resistance to carbendazim. *Australasian Plant Pathology*, 42(1): 73–78
- Li JL, Liu XY, Xie JT, Di YL, Zhu FX. 2014. A comparison of different estimation methods for fungicide EC₅₀ and EC₉₅ values. *Journal of Phytopathology*, 163(4): 239–244
- Liu X, Yu FW, Schnabel G, Wu JB, Wang ZY, Ma ZH. 2011. Paralogous *cyp51* genes in *Fusarium graminearum* mediate differential sensitivity to sterol demethylation inhibitors. *Fungal Genetics & Biology*, 48(2): 113–123
- Luo QQ, Xu JQ, Hou YP, Chen CJ, Wang JX, Zhou MG. 2009. PIRA-PCR for detection of *Fusarium graminearum* genotypes with moderate resistance to carbendazim. *Plant Pathology*, 58(5): 882–887

- Mellado E, Garcia-Effron G, Buitrago MJ, Alcazar-Fuoli L, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. 2005. Targeted gene disruption of the 14 α sterol demethylase (*cyp51A*) in *Aspergillus fumigatus* and its role in azole drug susceptibility. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, 49(6): 2536–2538
- Parry DW, Jenkinson P, McLeod L. 1995. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals: a review. *Plant Pathology*, 44(2): 207–238
- Qian HW, Duan ML, Sun XM, Chi MY, Zhao Y, Liang WX, Du J, Huang JG, Li BD. 2018. The binding mechanism between azoles and FgCYP51B, sterol 14 α -demethylase of *Fusarium graminearum*. *Pest Management Science*, 74(1): 126–134
- Qiu JB, Xu JQ, Yu JJ, Bi CW, Chen CJ, Zhou MG. 2011. Localisation of the benzimidazole fungicide binding site of *Gibberella zeae* β_2 -tubulin studied by site-directed mutagenesis. *Pest Management Science*, 67: 191–198
- Siegel MR. 1981. Sterol-inhibiting fungicides-effects on sterol biosynthesis and sites of action. *Plant Disease*, 65(12): 986–989
- Sun LF, Zhang YH, Pei KQ. 2009. A rapid extraction of genomic DNA from fungi. *Mycosystema*, 28(2): 299–302 (in Chinese) [孙立夫, 张艳华, 裴克全. 2009. 一种高效提取真菌总DNA的方法. 菌物学报, 28(2): 299–302]
- Sun XP, Wang JY, Feng D, Ma ZH, Li HY. 2011. *PdCYP51B*, a new putative sterol 14 α -demethylase gene of *Penicillium digitatum* involved in resistance to imazalil and other fungicides inhibiting ergosterol synthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(4): 1107–1119
- Tang SS, Liu ZH, Yu CG, Zhao TC. 2014. Toxicity determination and proportioning tests of nine fungicides to *Colletotrichum orbiculare*. *Plant Protection*, 40(6): 171–175 (in Chinese) [唐爽爽, 刘志恒, 余朝阁, 赵廷昌. 2014. 9种杀菌剂对西瓜炭疽病菌的室内毒力测定及配比试验. 植物保护, 40(6): 171–175]
- Wang GH. 2010. Functional characterization of *AMT1* gene in *Fusarium graminearum*. Master Thesis. Yangling: Northwest A&F University (in Chinese) [王光辉. 2010. 禾谷镰刀菌 *AMT1* 基因的功能研究. 硕士学位论文. 杨凌: 西北农林科技大学]
- Wang XK, Guo BB, Gao YY, Yang MW, Liu F. 2017. The toxicity of six triazole fungicides to *Cladosporium fulvum* and their safety and field efficacy in the control of tomato leaf mold. *Journal of Plant Protection*, 44(4): 671–678 (in Chinese) [王晓坤, 郭贝贝, 高杨杨, 杨慕卫, 刘峰. 2017. 六种三唑类杀菌剂对番茄叶霉病菌的毒力及其安全性和田间防效评价. 植物保护学报, 44(4): 671–678]
- Xu X, Niholsonc P. 2009. Community ecology of fungal pathogens causing wheat head blight. *Annual Review of Phytopathology*, 47: 83–103
- Yan X. 2012. Functional analysis of novel pathogenicity-related genes involved in ergosterol biosynthesis pathway and cAMP-PKA signaling pathway in *Magnaporthe oryzae*. Ph. D Thesis. Hangzhou: Zhejiang University (in Chinese) [闫霞. 2012. 稻瘟病菌麦角甾醇生物合成途径和cAMP-PKA信号途径致病相关新基因功能研究. 博士学位论文. 杭州: 浙江大学]
- Yan X, Ma WB, Li Y, Wang H, Que YW, Ma ZH, Talbot NJ, Wang ZY. 2011. A sterol 14 α -demethylase is required for conidiation, virulence and for mediating sensitivity to sterol demethylation inhibitors by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genetics and Biology*, 48(2): 144–153
- Yin Y, Liu X, Li B, Ma Z. 2009. Characterization of sterol demethylation inhibitor-resistant isolates of *Fusarium asiaticum* and *F. graminearum* collected from wheat in China. *Phytopathology*, 99(5): 487–497
- Yuan S, Zhou M. 2005. A major gene for resistance to carbendazim, in field isolates of *Gibberella zeae*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 27(1): 58–63

(责任编辑:张俊芳)