



杀菌剂生物学实验室

Laboratory of Fungicide Biology

实验室简介

自20世纪20年代，许多著名教授在此研究和应用杀菌剂生物学。相继有俞大绂教授等在中国最早研究碳酸铜及汞制剂防治小麦黑穗病，并在华东和华北地区大面积推广应用；魏景超教授等研究和应用波尔多液和石硫合剂防治果树和蔬菜病害；方中达教授等研究和推广应用盐酸种子处理等技术防治水稻白叶枯病；刘经芬、叶钟音教授等研究现代杀菌剂的应用技术。

实验室现有研究人员6人，其中教授2人，副教授2人，讲师2人。主要研究杀菌剂生物学及植物病害化学防控的基础理论与应用技术，包括杀菌剂生物活性及应用原理、杀菌剂毒理和抗性机制、抗药性病害流行预警及治理。利用传统和现代分子生物学技术，建立杀菌剂抗性诊断、监测、预警及新型杀菌剂高效筛选技术平台，构建植物病害化学防治策略和技术体系。近三年主持国家和省部级项目10余项，企业合作项目50余项；先后发表论文250余篇(SCI 80多篇)，申请发明专利30余项。2010年和2012年获得国家科技进步二等奖2项，2005年以来获得省部级科技进步和发明二等奖3项。1人入选欧盟“1986-1992年为中国培养100名博士后人才计划及25名重点跟踪培养人才计划”。1人被科技部聘为国家重点基础研究发展计划领域(973)咨询专家。该实验室是中国植物病理学会化学防治专业委员会自1998年成立以来的依托单位。

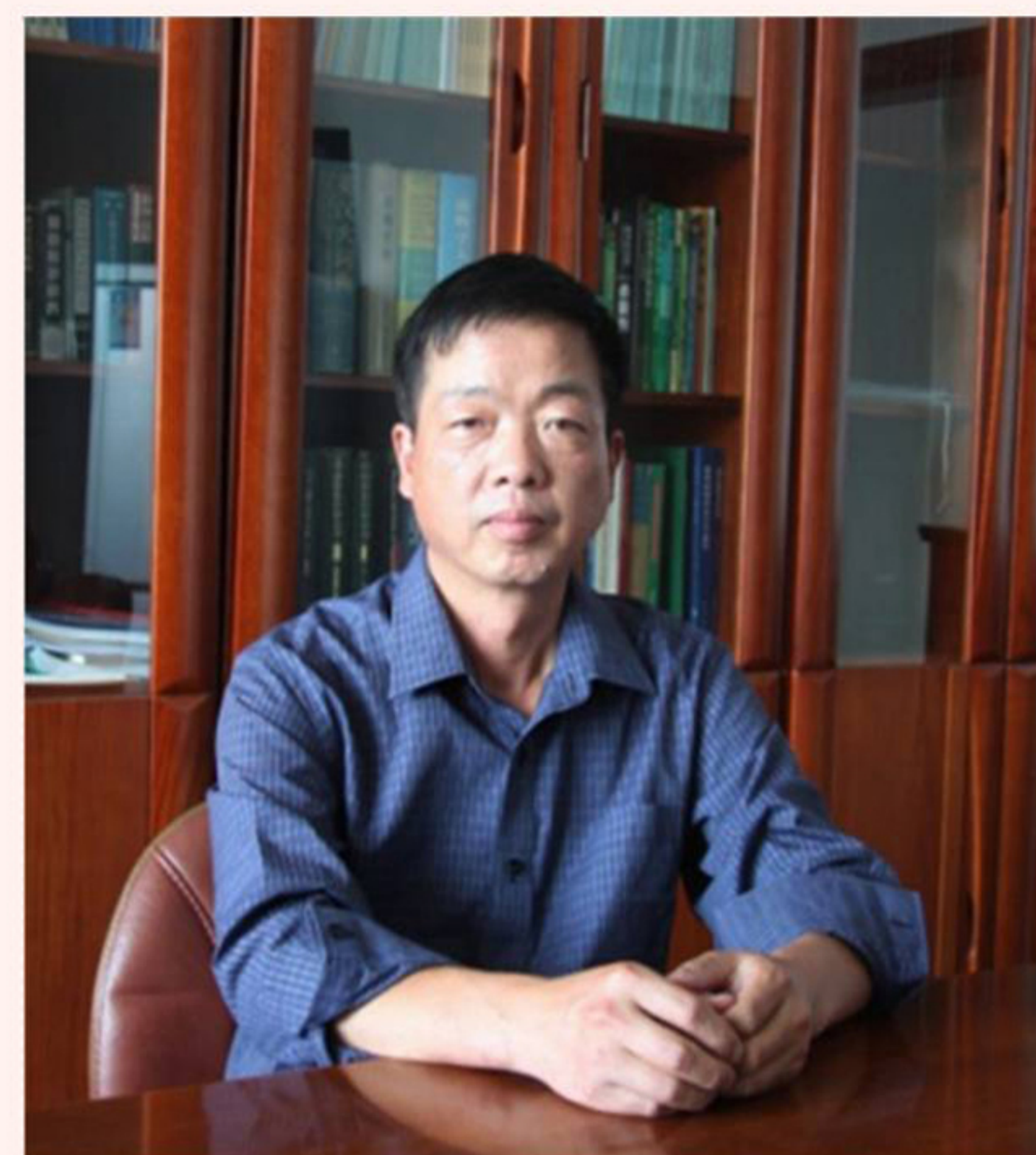
团队负责人及团队成员



团队负责人：周明国 教授 博士生导师
中国植物病理学会化学防治专业委员会主任委员
农业部农业有害生物抗药性监测与风险评估专家



团队成员：陈长军 教授 博士生导师
中国植物病理学会化学防治专业委员会秘书



团队成员：王建新 高级实验师



团队成员：侯毅平 副教授 硕士生导师



团队成员：段亚冰 讲师 博士



团队成员：贾晓静 助研 硕士



杀菌剂生物学实验室

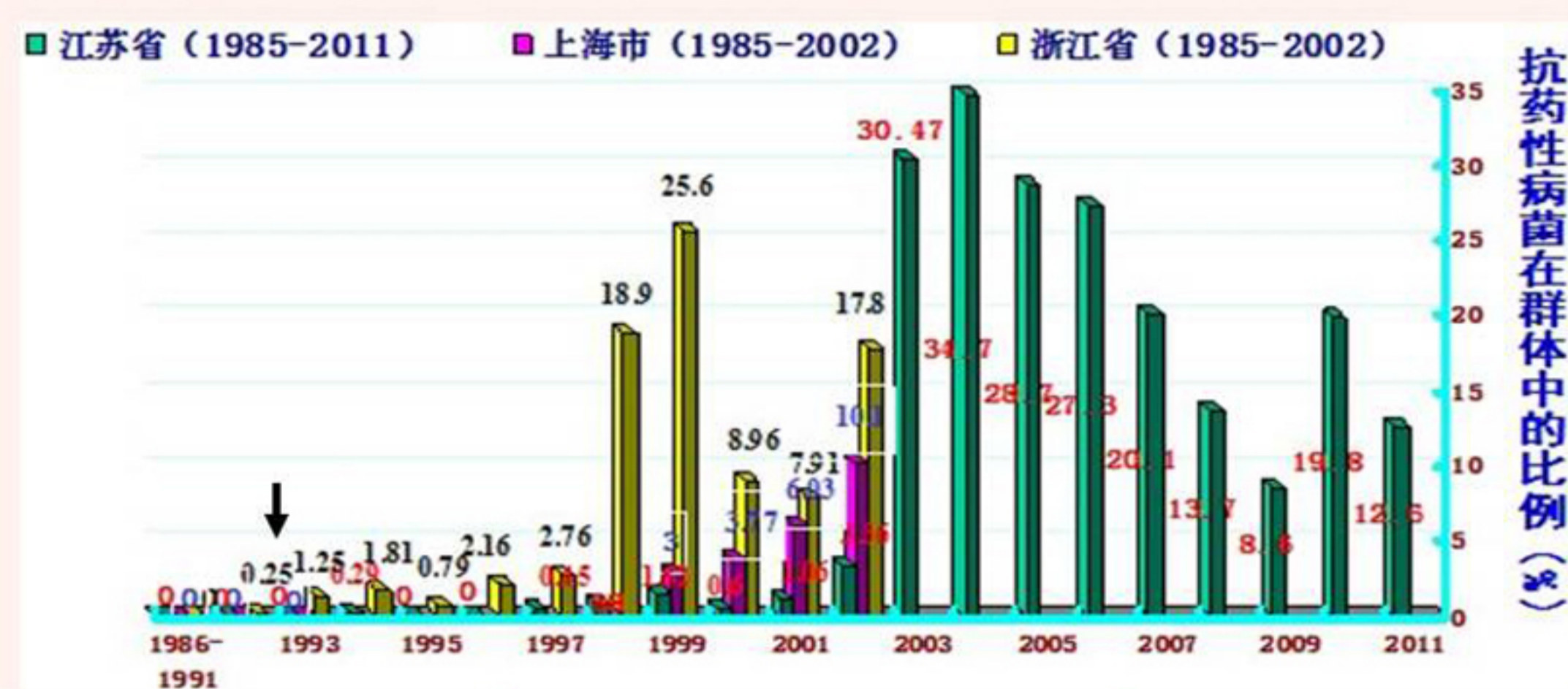
Laboratory of Fungicide Biology

小麦赤霉病抗药性研究

小麦赤霉病是中国小麦生产上最重要的病害之一，该病害不仅造成小麦严重减产，而且病菌产生的真菌毒素（主要是DON毒素）污染小麦，对人畜有严重的急性和慢性毒性，威胁粮食安全和食品安全。由于缺乏免疫和高水平抗病品种，在小麦抽穗扬花期喷施杀菌剂是国内外控制赤霉病的重要措施。我国自20世纪70年代中期以来，主要依赖多菌灵、硫菌灵等苯并咪唑类杀菌剂进行防治。针对苯并咪唑类杀菌剂抗性的高风险，自1985年开始系统监测了小麦赤霉病菌对多菌灵的抗药性，在国际上首次报道了小麦赤霉病菌对苯并咪唑类杀菌剂产生了抗药性，并提出病害严重度和杀菌剂选择压力是加速抗药性病原群体形成的关键因子。利用细胞学、遗传学、分子生物学和生物化学等研究手段，发现并证明了多菌灵对小麦赤霉病菌新的分子靶标 β_2 -微管蛋白，及该基因第17、167、198和200位密码子变异形成多种抗药性基因型，首次研发出不同抗药性基因型的系列快速诊断和高通量分子检测技术，实现了小麦赤霉病菌抗药性早期预警。与企业合作先后研发并产业化应用多福酮、戊福、氰烯菌酯等治理抗药性的新型杀菌剂。

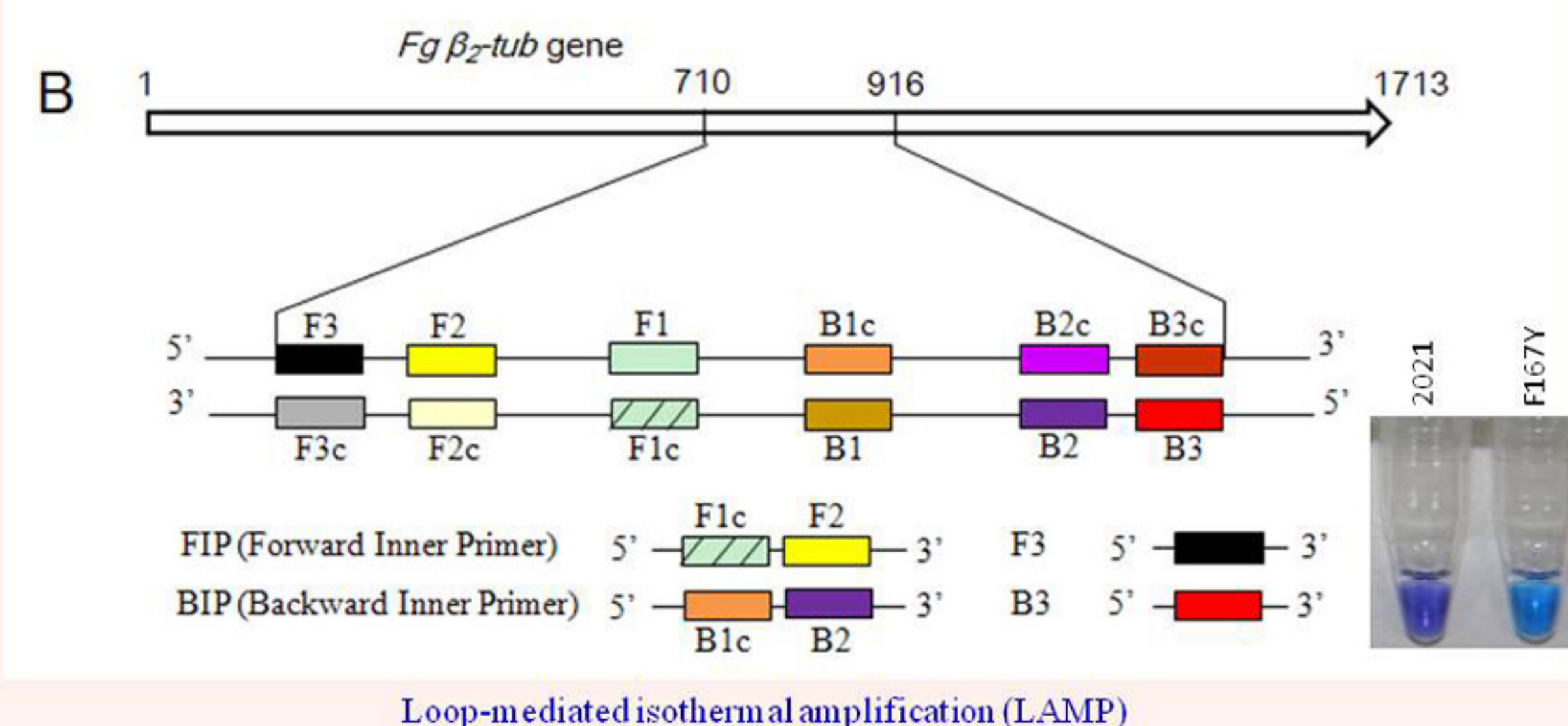
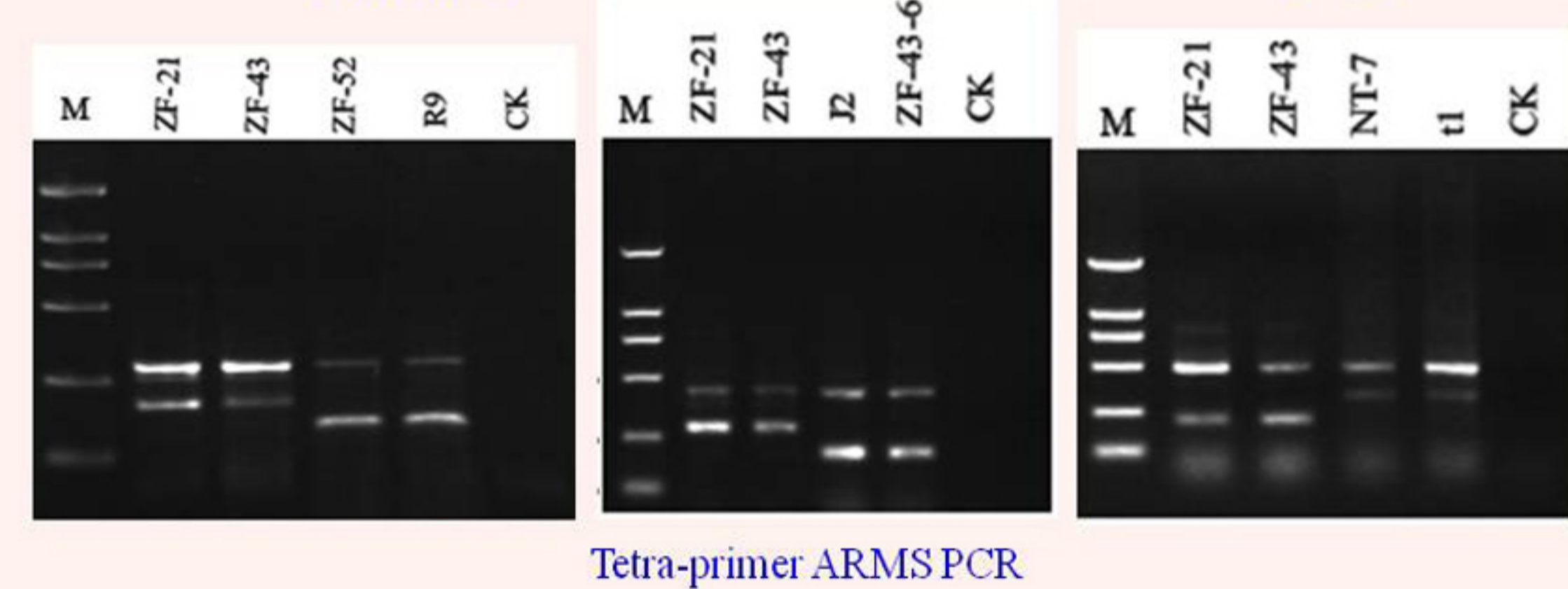
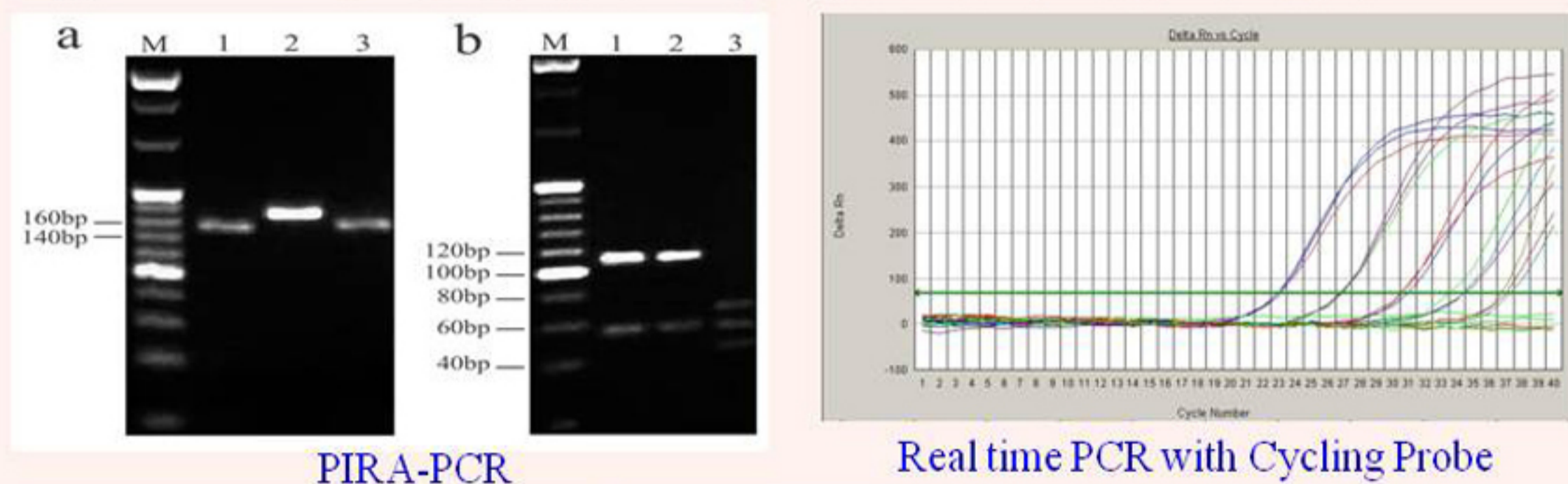
抗药性赤霉病菌群体发展态势监测

1992年首次在田间发现抗多菌灵的小麦赤霉病菌。连续26年抗药性监测，发现我国局部地区赤霉病严重发生是抗药性造成的多菌灵防治失败。



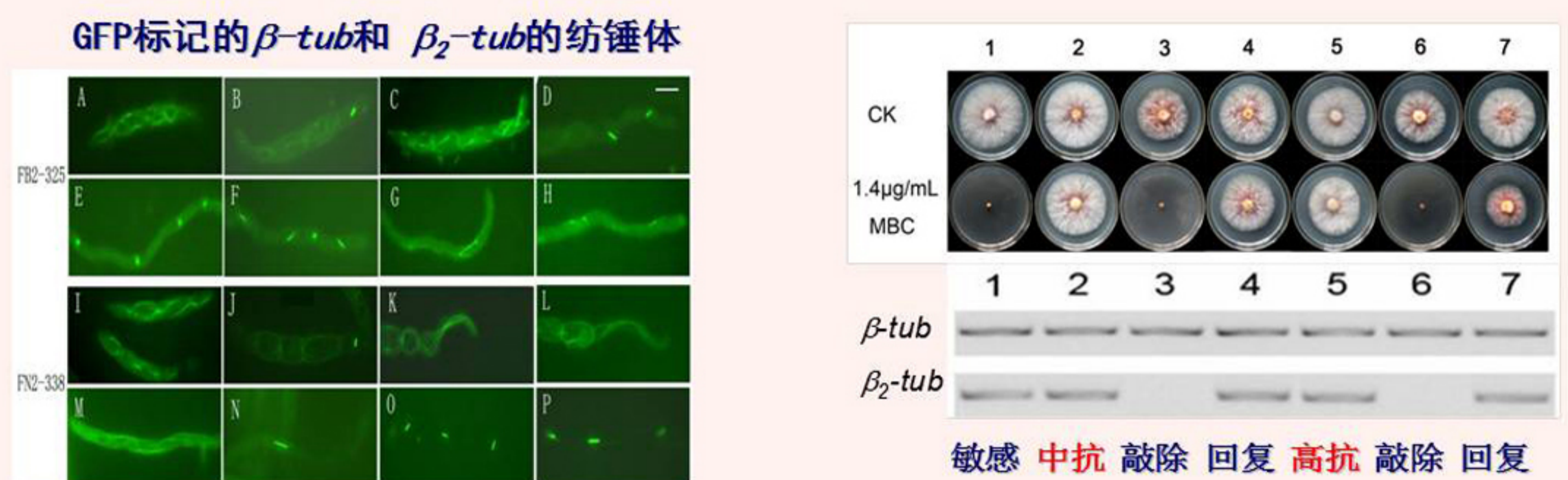
抗药性基因分子检测

发明了检测 β_2 -微管蛋白基因点突变的抗药性快速诊断技术PIRA-PCR、Tetra-primer ARMS PCR和Real time PCR with Cycling Probe。诊断时间由4-5天缩短到4小时，准确率100%。

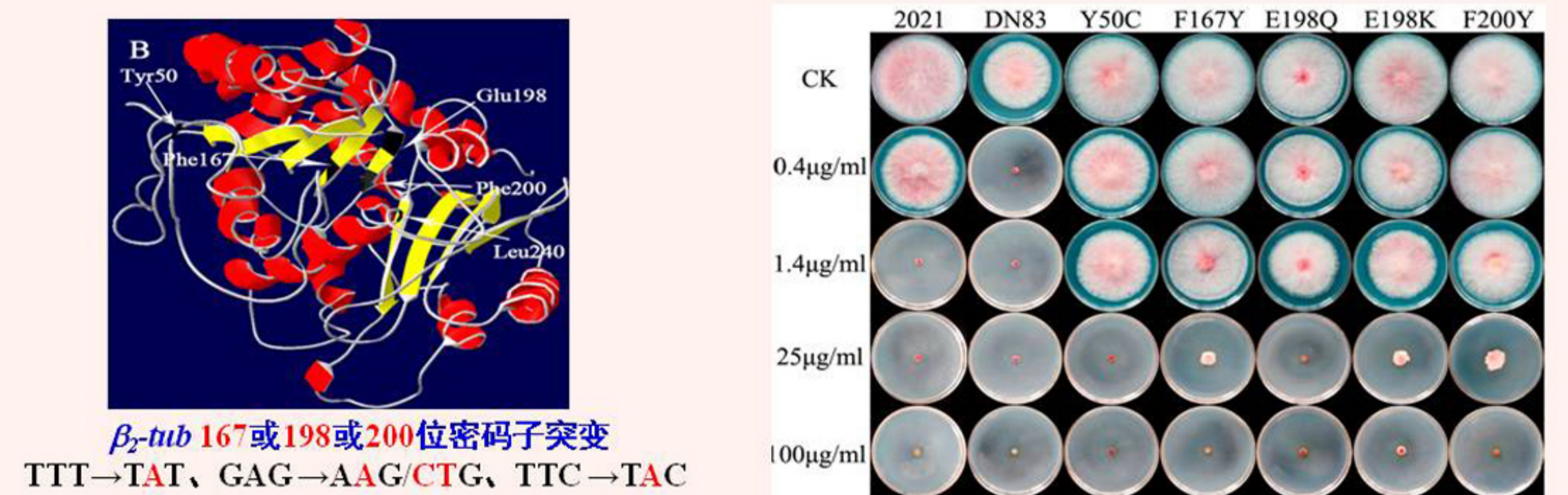


小麦赤霉病菌特殊的抗药性新机制

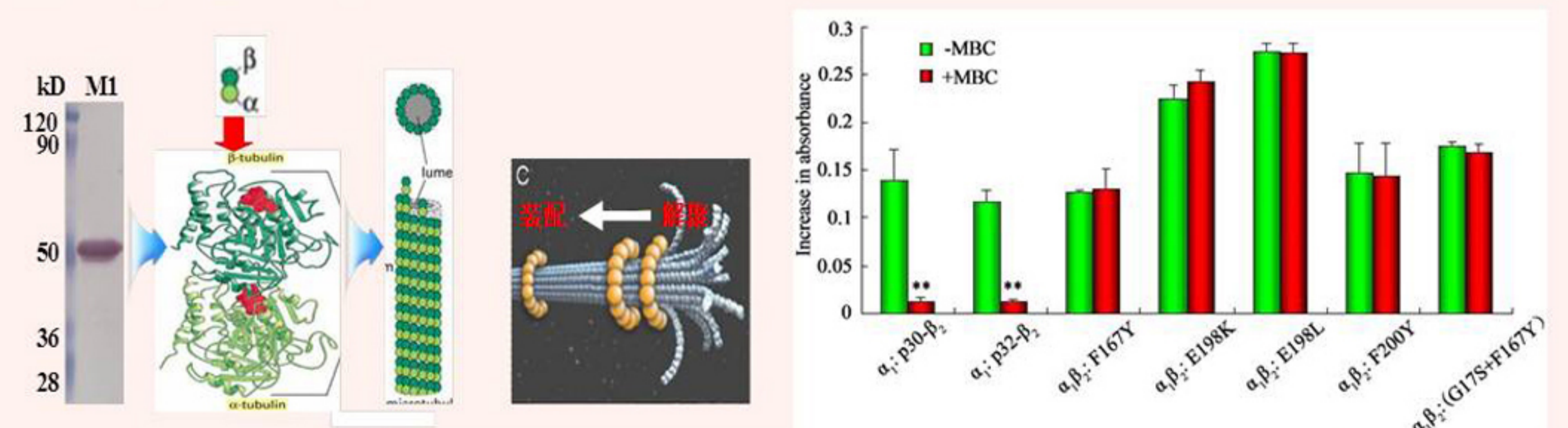
1、通过基因克隆和荧光标记，发现并命名了参与纺锤体形成的赤霉病菌抗药性基因—— β_2 -微管蛋白基因，并通过基因敲除/回复和置换得到表型验证。



2、发现 β_2 -微管蛋白基因的多菌灵结合域可在167、198和200位密码子发生点突变，产生多种表型的抗药性基因型，其中以167位点突变为常见，表现中等水平抗性；并通过对抗药性基因单碱基定点突变，和无标记两步交换新技术，验证了不同碱基变异引起的抗药性表型变化。

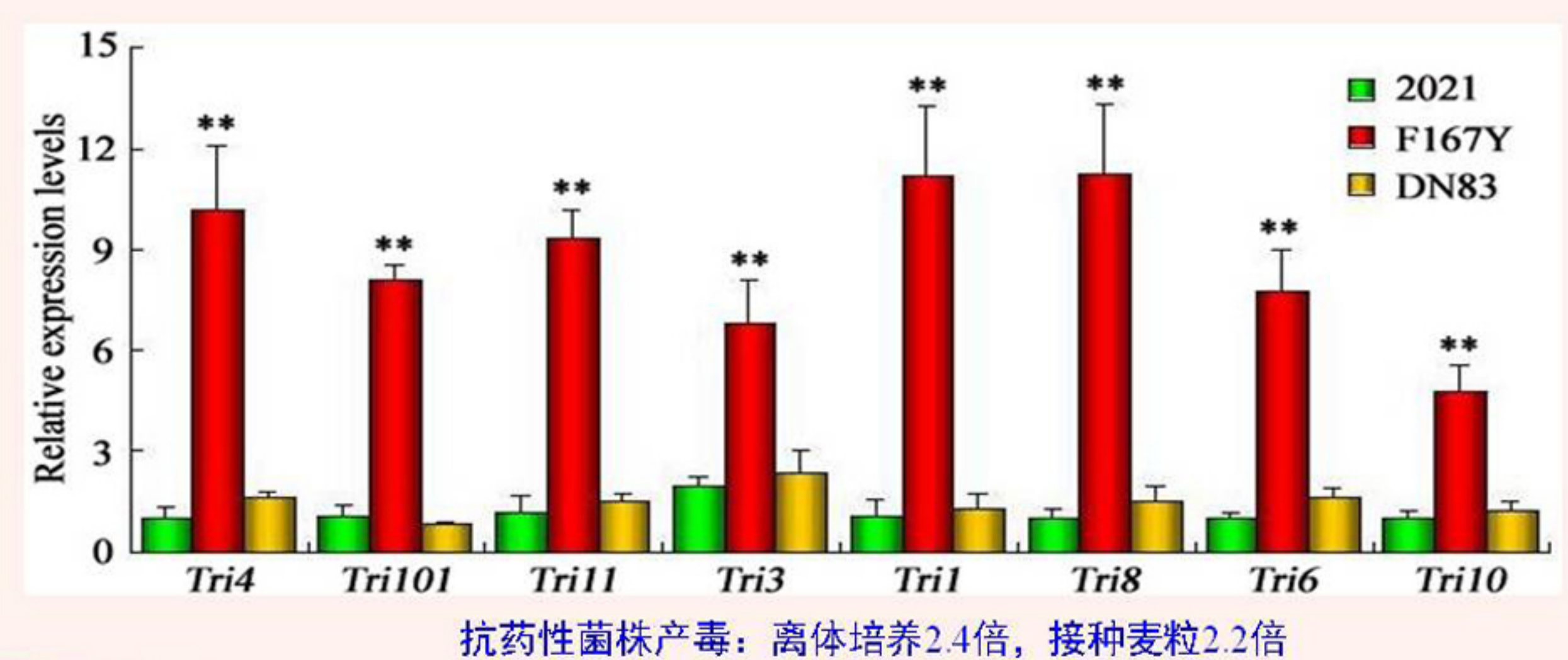


3、突破了真菌微管蛋白的体外表达、纯化、复性和装配及其与药剂亲和力检测的技术瓶颈，发现多菌灵强烈抑制敏感菌株的微管蛋白装配，但不能抑制发生抗药性变异的微管蛋白装配。



抗药性点突变上调DON毒素合成基因表达

在国际上首次发现 β_2 -基因单碱基变异，可调控毒素合成基因簇上调表达；探明了抗药性赤霉病菌加倍产生真菌毒素的原因。





杀菌剂生物学实验室

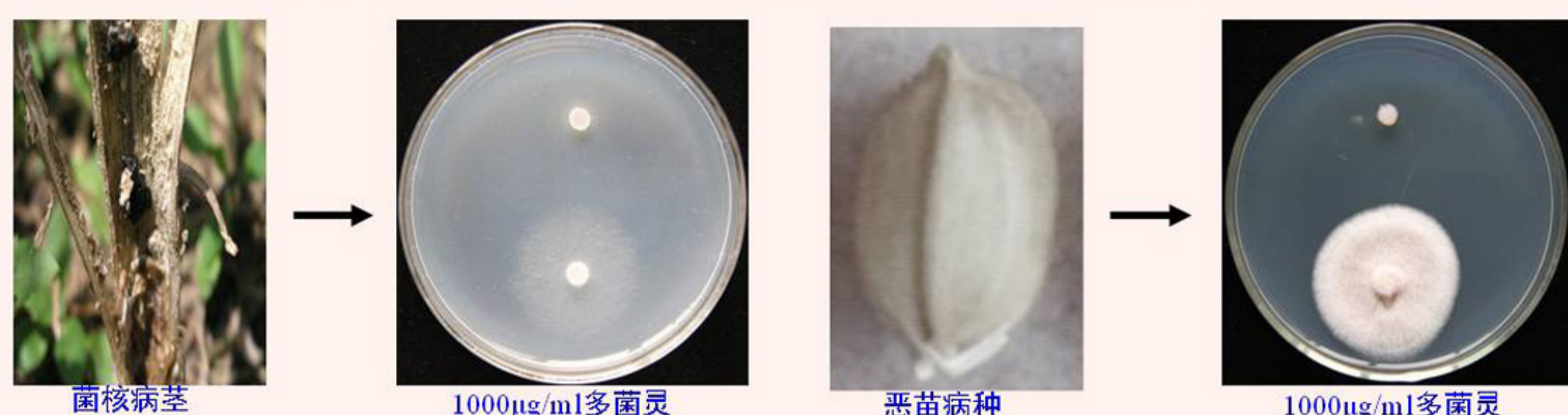
Laboratory of Fungicide Biology

油菜菌核病和水稻恶苗病抗药性研究

油菜菌核病是我国各油菜产区最重要的真菌病害，尤其在长江流域和东南沿海地区危害最为严重，常年减产10%-30%，重病年减产50%以上；水稻恶苗病是最重要的种传病害之一，对早育秧水稻可造成毁灭性危害。本实验室针对我国长期依赖多菌灵防治油菜菌核病和水稻恶苗病的状况，对两种病原菌的抗药性进行了系统监测，并在抗药性发生规律和抗药性机制的研究基础上，研发了抗药性高通量分子检测技术，研发并大面积推广了相应的抗药性治理技术，为我国近20年来成功避免抗药性病害流行作出了重要贡献。

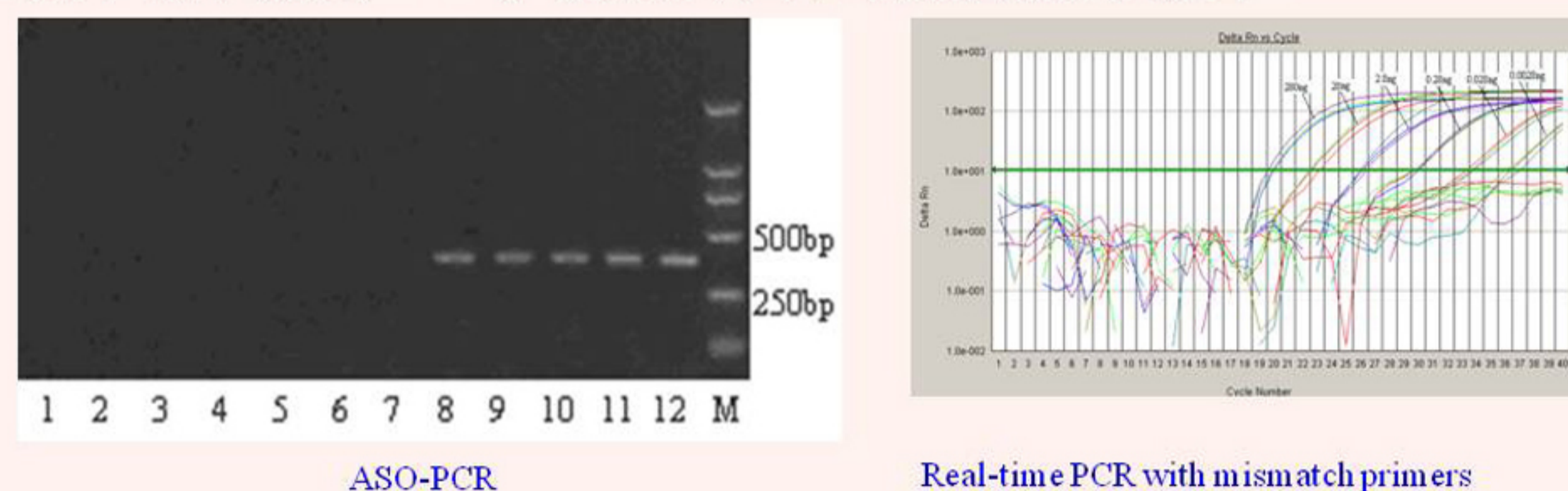
两种病原菌抗药性监测技术

建立了从样本采集、分离培养到药敏性测定的两种病菌抗药性监测技术。

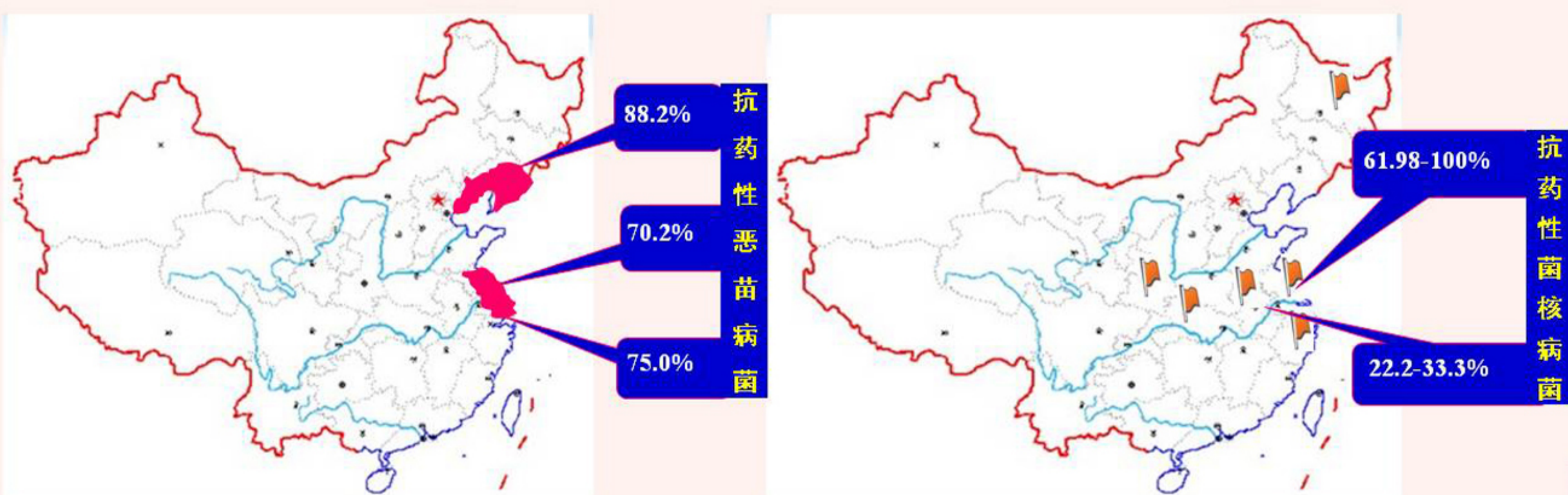


两种病原菌抗药性分子诊断和高通量检测技术

将抗药性突变碱基设计为引物3'-末端，发明了ASO-PCR，或者利用突变形成的酶切位点，发明了内切酶法等两种油菜菌核病菌抗药性快速诊断技术；通过创新设计3'-末端的倒数第2碱基错配引物，扩大变异信号的策略，发明了适合菌核病菌的高通量、定量PCR检测技术及LAMP快速检测技术，抗药性基因检出频率达1/10万，而且避免了假阳性，检测准确率接近100%，使抗药性早期预警成为现实。



两种抗药性病原菌的分布及在群体中的比例

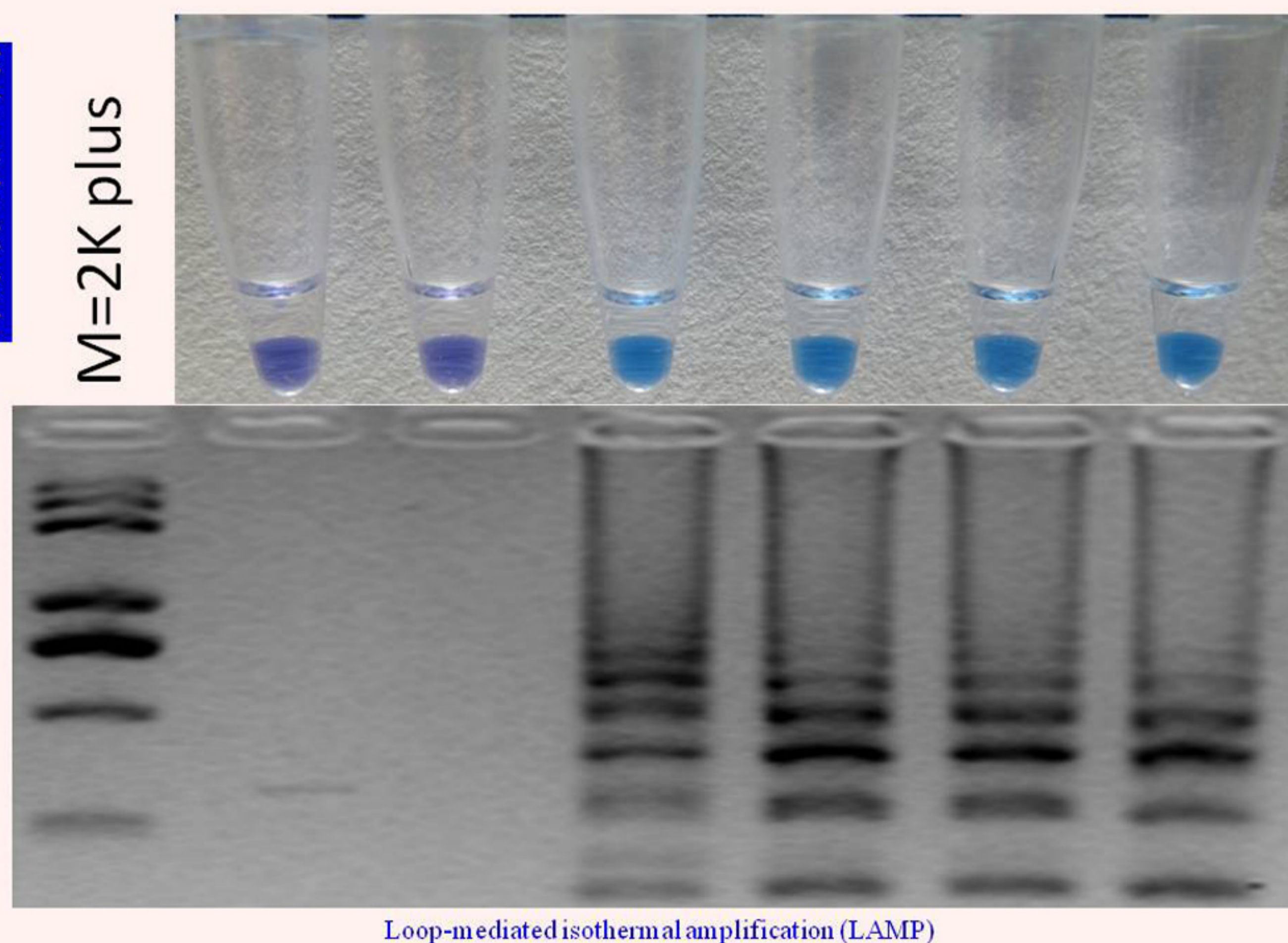


两种病原菌的抗药性机制

通过基因克隆、基因敲除与回复、以及定点单碱基突变的抗药性表型分析等技术，研究探明了恶苗病菌和菌核病菌β-微管蛋白基因198位密码子点突变，是对多菌灵表现极高水平抗性的主要机制。

β -tub 198位密码子GAG (谷氨酸) → GCG (丙氨酸)

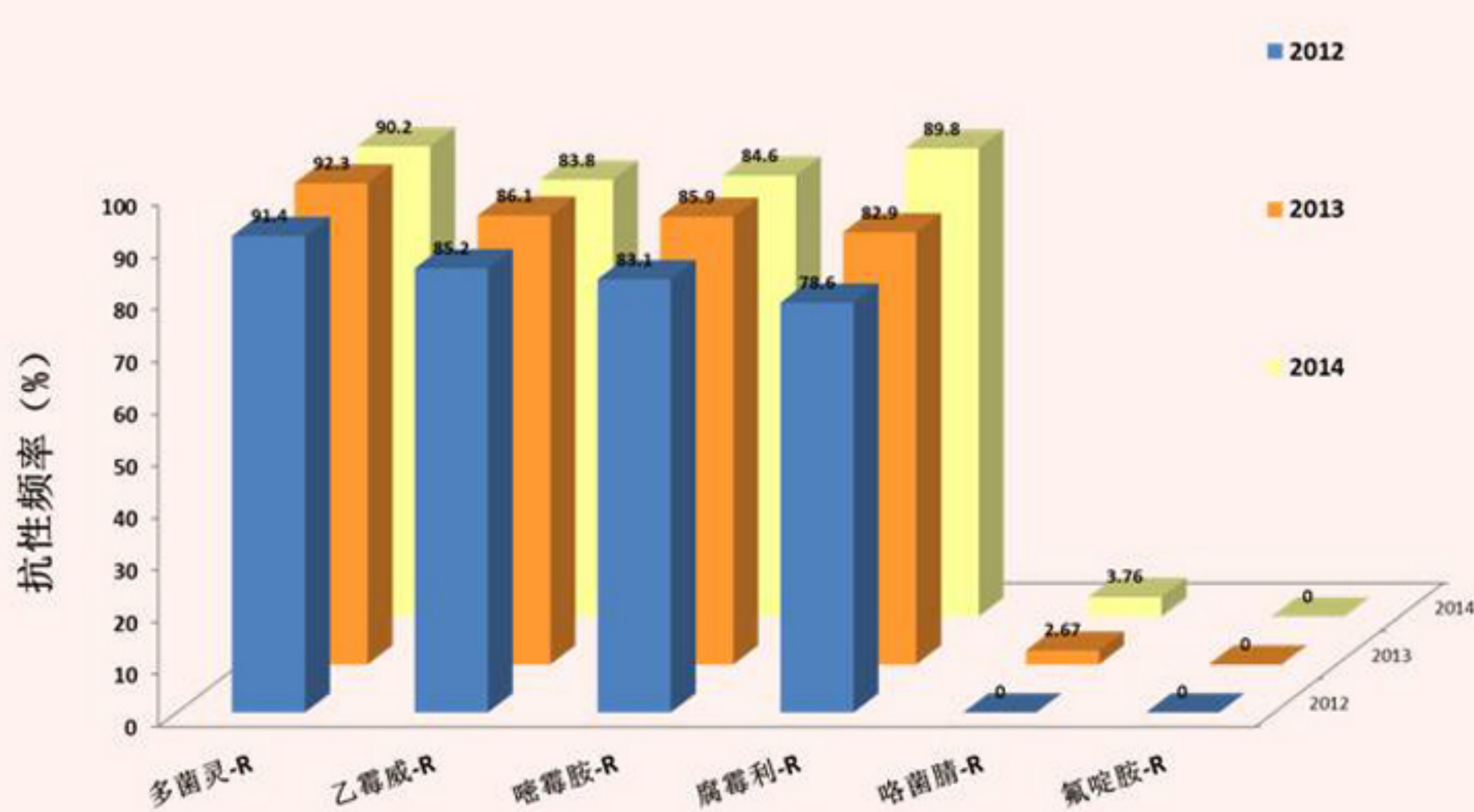
↓
极高水平抗药性，多菌灵完全失效



灰霉病抗药性研究

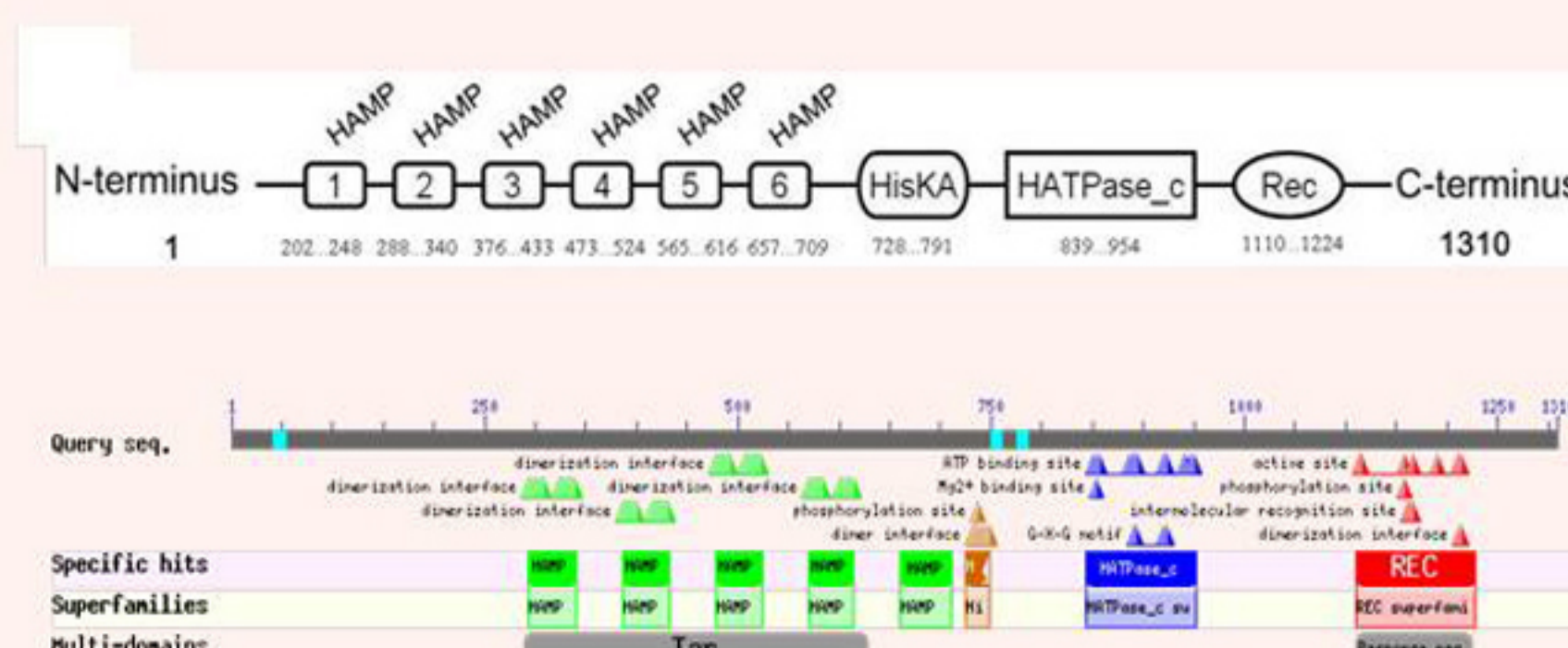
由灰葡萄孢菌 (*Botrytis cinerea*) 引起的灰霉病是一种世界性病害，可侵染200多种果蔬类作物。2012-2014年，对江苏南京及镇江地区、山东寿光和潍坊草莓、番茄和药芹等作物灰霉病抗药性监测结果表明：灰霉病菌多重抗药性群体已占总群体50%以上；2013年首次监测到抗咯菌腈菌株，次年呈上升趋势。因此，病害防控面临严峻挑战。

灰霉病抗药性监测



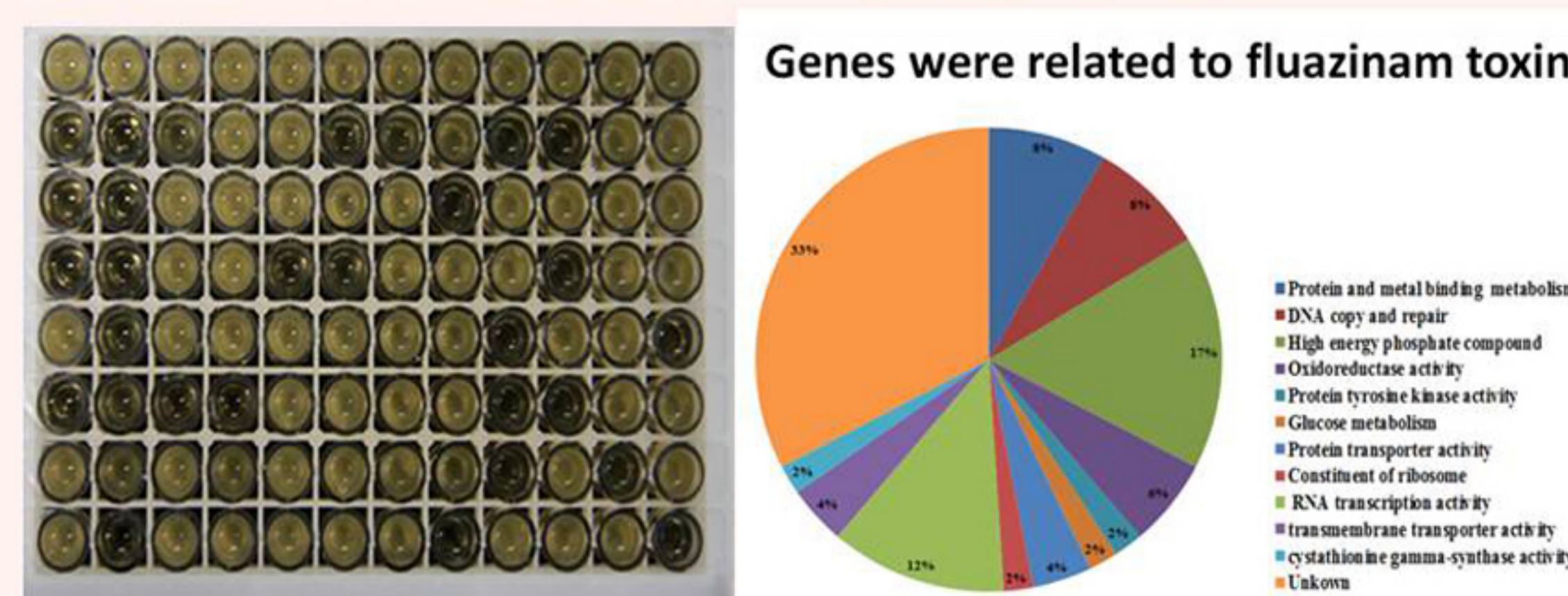
咯菌腈抗药性机制

在国际上率先发现田间抗咯菌腈的灰霉病菌高抗群体，其抗药性与OS1基因所编码蛋白的HAMP区点突变或重排相关。



氟唑菌酰胺毒理学

氟唑菌酰胺是广谱高效的保护性杀菌剂，对灰霉病防治优异。通过对酵母突变库筛选，获得了49个与药敏性相关的基因，编码包括参与离子转运、能量代谢、核糖体功能、核酸加工、氨基酸合成等蛋白。





杀菌剂生物学实验室

Laboratory of Fungicide Biology

水稻白叶枯病菌抗药性研究

水稻白叶枯病是由水稻黄单胞杆菌水稻致病变种 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) 引起的一种细菌性病害, 可造成水稻产量10%以上的损失。噻枯唑和链霉素是我国应急防治水稻白叶枯病最主要的两种杀菌剂。本实验室自20世纪90年代开始监测和检测了水稻白叶枯病菌的抗药性, 首次报道了室内检测不到的田间噻枯唑抗性, 和田间存在对多种抗生素表现高水平抗药性的超级水稻白叶枯病菌。

水稻白叶枯病菌抗药性诊断技术和监测

1、建立了在300 μg/ml 噻枯唑处理稻苗上的噻枯唑抗性诊断技术和在含10 μg/ml链霉素的NA平板上的链霉素抗性诊断技术。



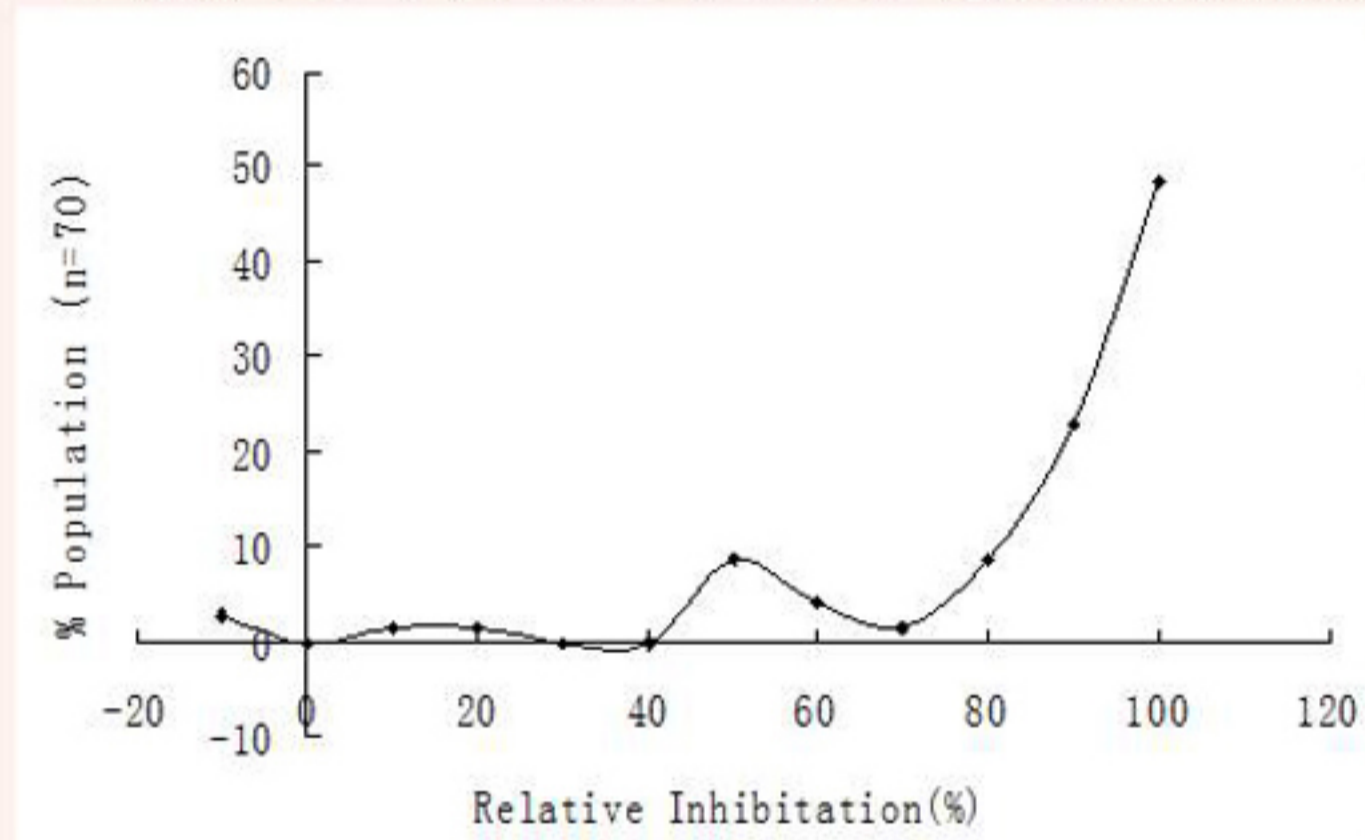
喷施噻枯唑300μg/ml水稻叶片上抗性筛选



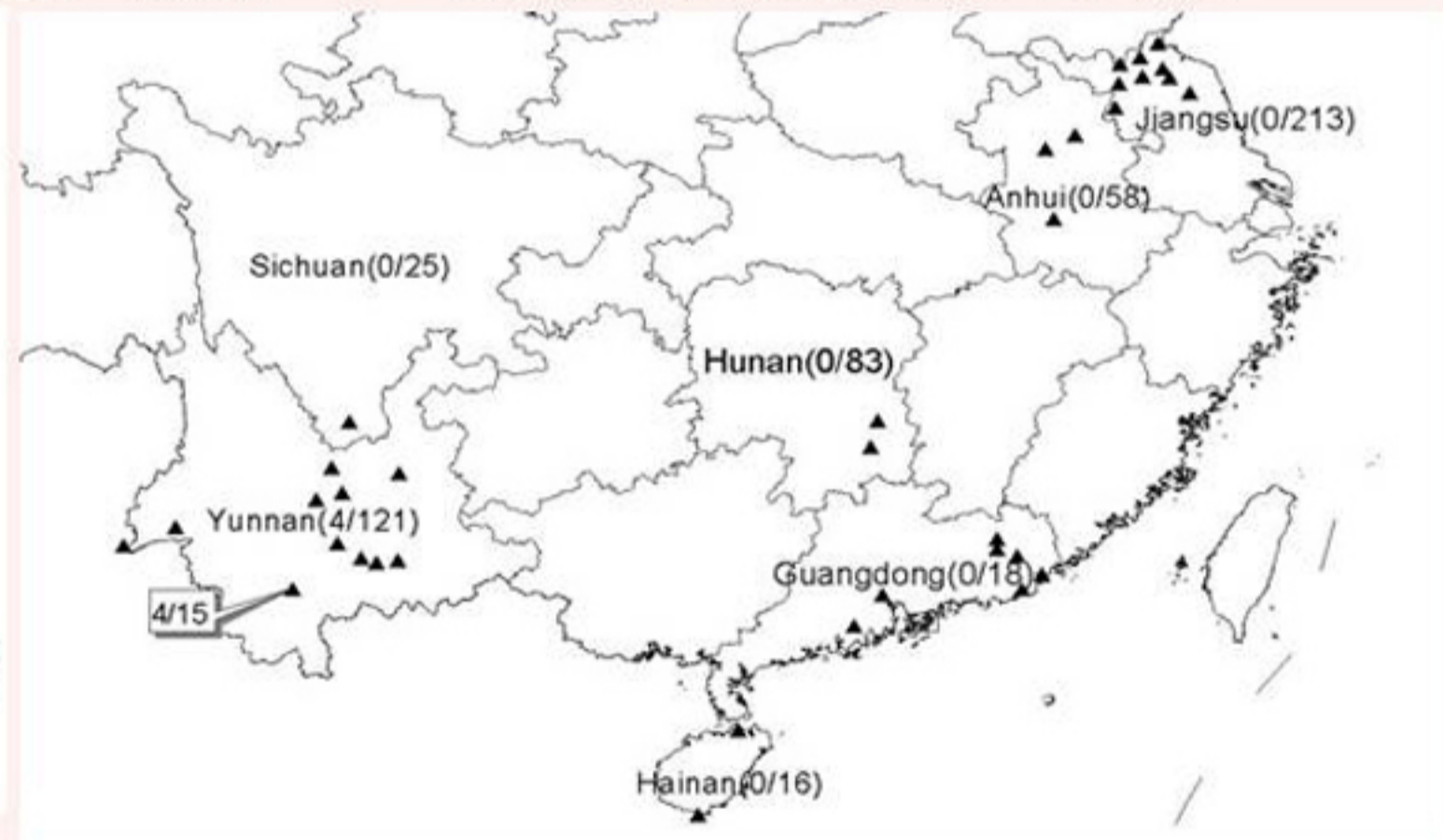
10μg/ml链霉素

2、发现我国水稻主产区普遍存在白叶枯病菌对噻枯唑的抗药性群体, 抗药性菌株占群体的10%~20%左右。

云南普洱县存在对链霉素的抗药性菌株, 平均抗药性倍数为226倍。



300μg/ml噻枯唑对水稻白叶枯病菌田间分离菌株相对抑制率的分布频率



水稻白叶枯病菌链霉素抗性菌株和敏感菌株的地理分布

水稻白叶枯病菌对拌种灵的抗药性机制

拌种灵是我国唯一生产的具有噻唑和羧酰替苯胺组合化学杀菌剂。本实验室发现该杀菌剂能够强烈抑制水稻白叶枯病菌的琥珀酸脱氢酶活性, 并证明琥珀酸脱氢酶B亚基基因229位点突变是病原菌产生抗药性的机制。

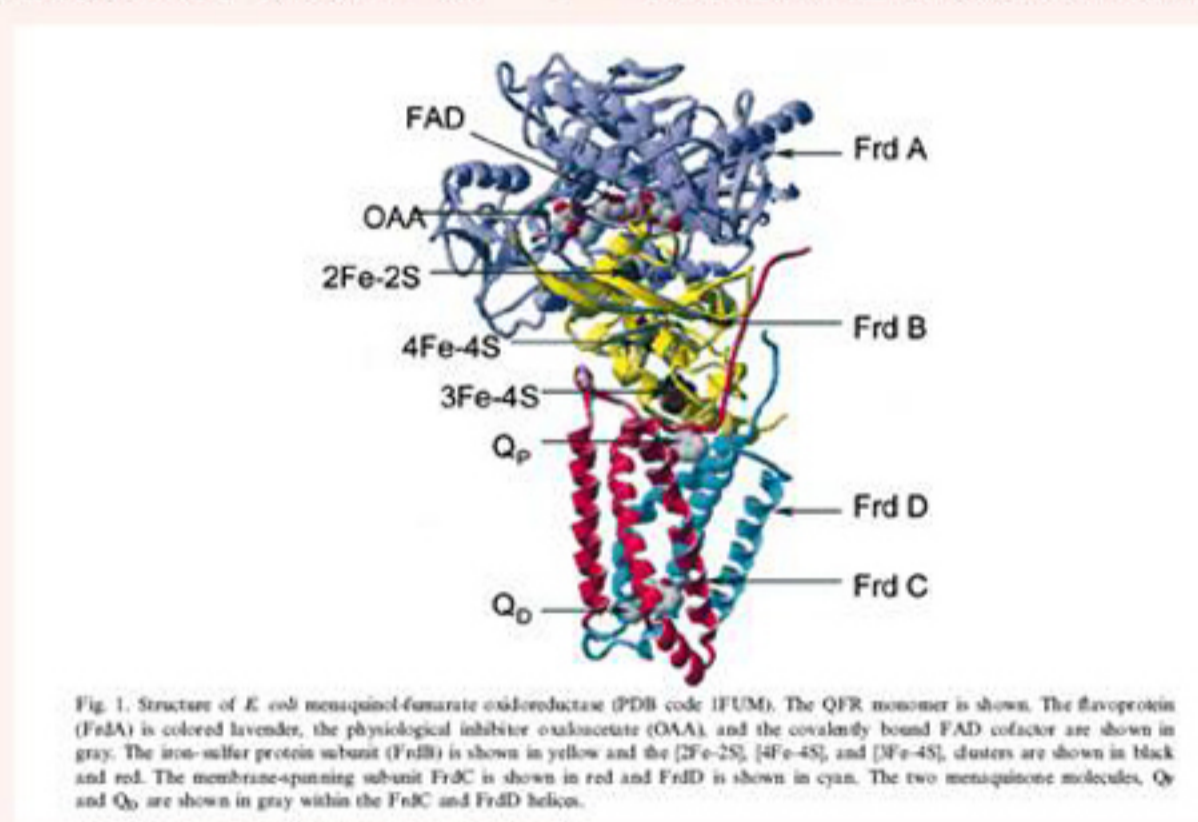
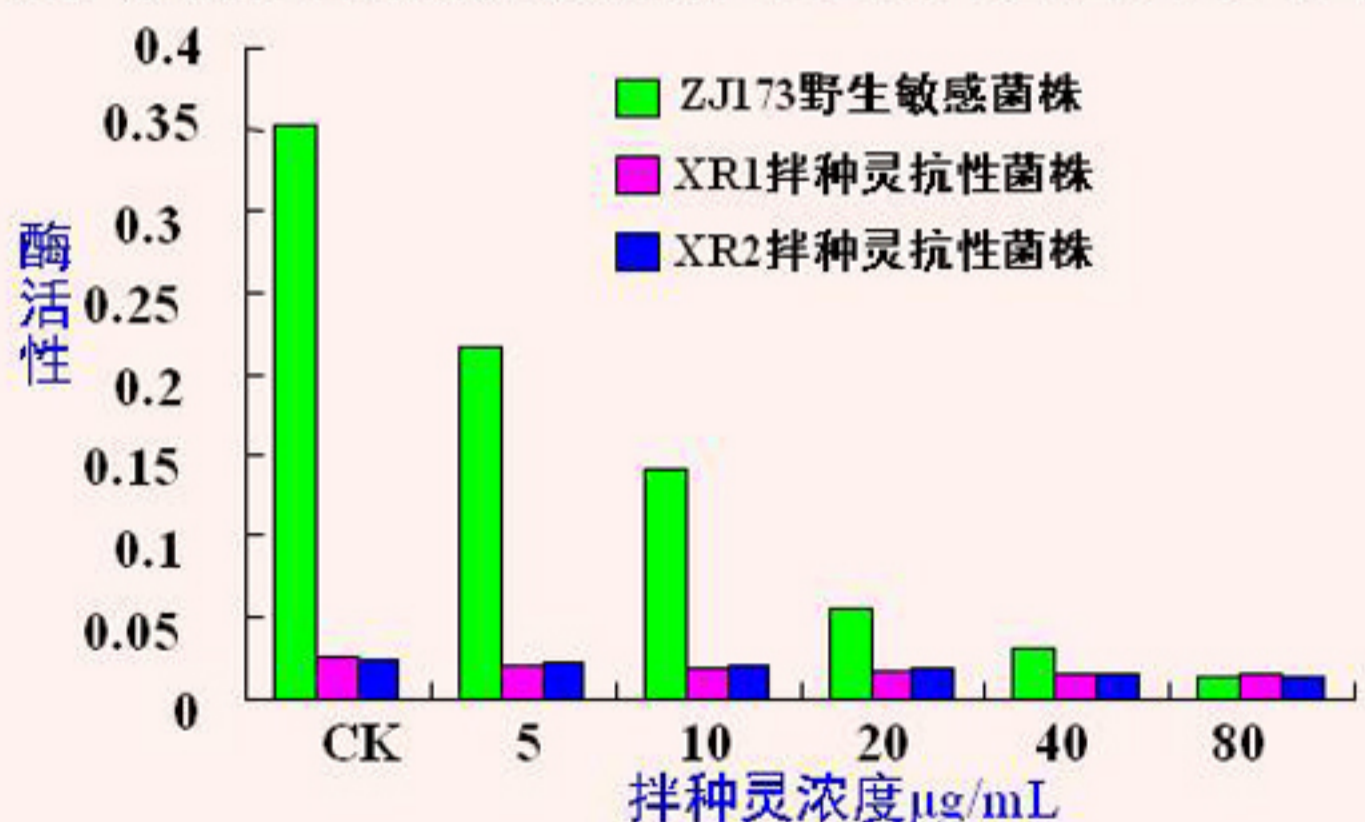
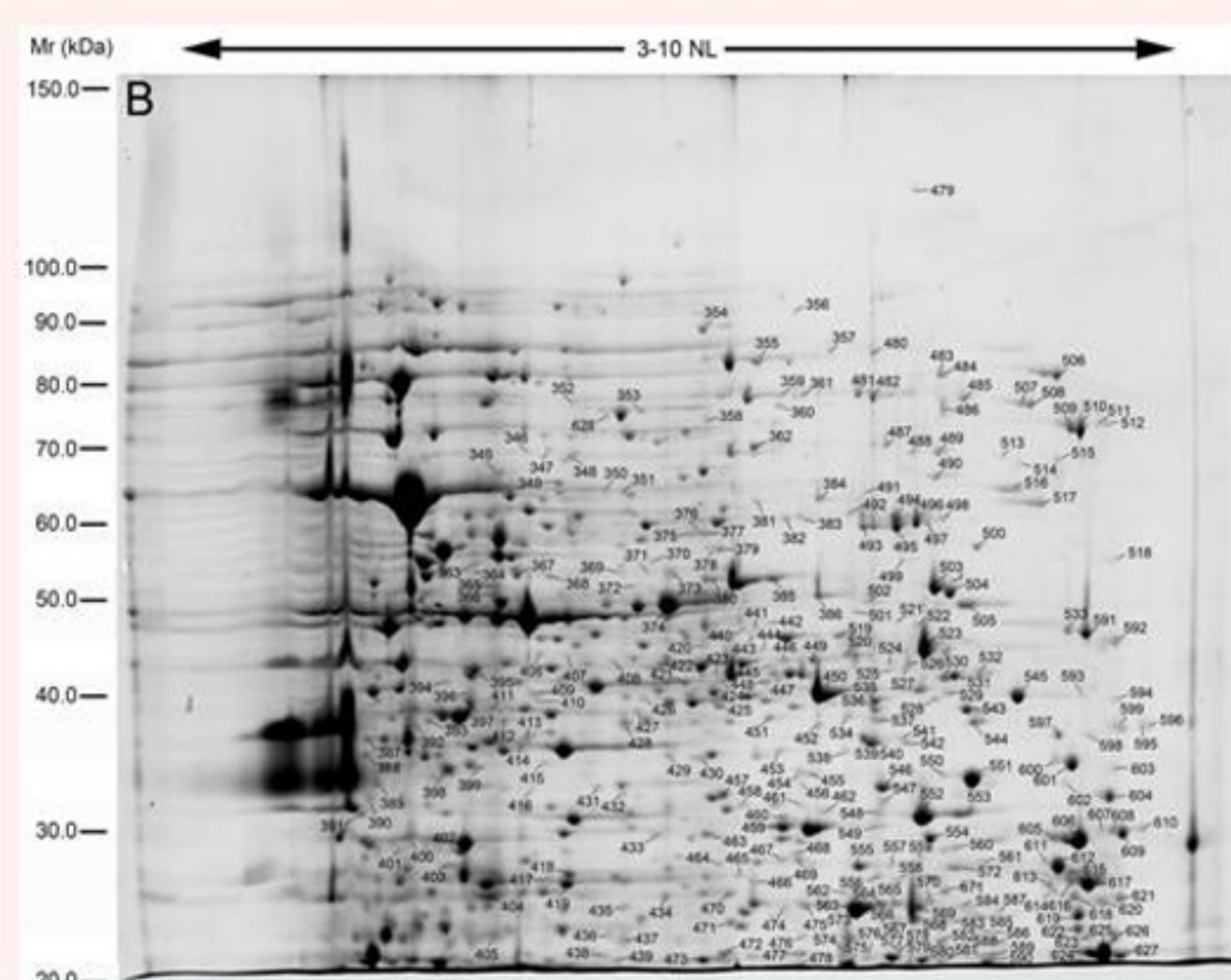


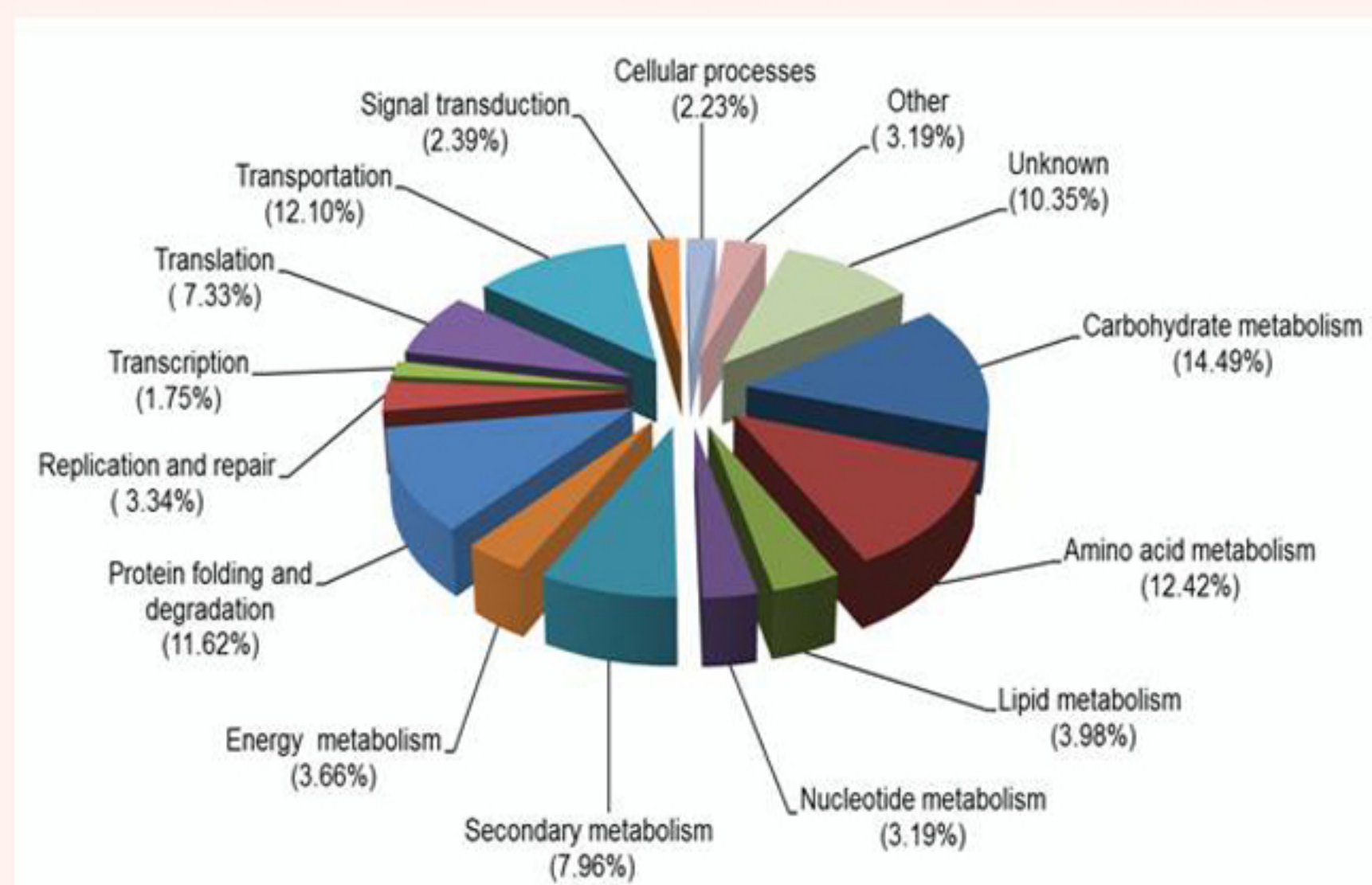
Fig. 1. Structure of *K. oryzae* succinate dehydrogenase (SDH) subunit B (SDH-B). The FAD domain is shown. The structure of FAD is shown in yellow. The phenylalanine residue (Phe229) and the conserved histidine (His229) are shown in grey. The two metal-binding sites (Mn1 and Mn2) are shown in red and blue. The two metal-binding sites (Mn1 and Mn2) are shown in grey within the FAD and FAD-B domain.

申嗪霉素对水稻白叶枯病菌的作用靶标研究

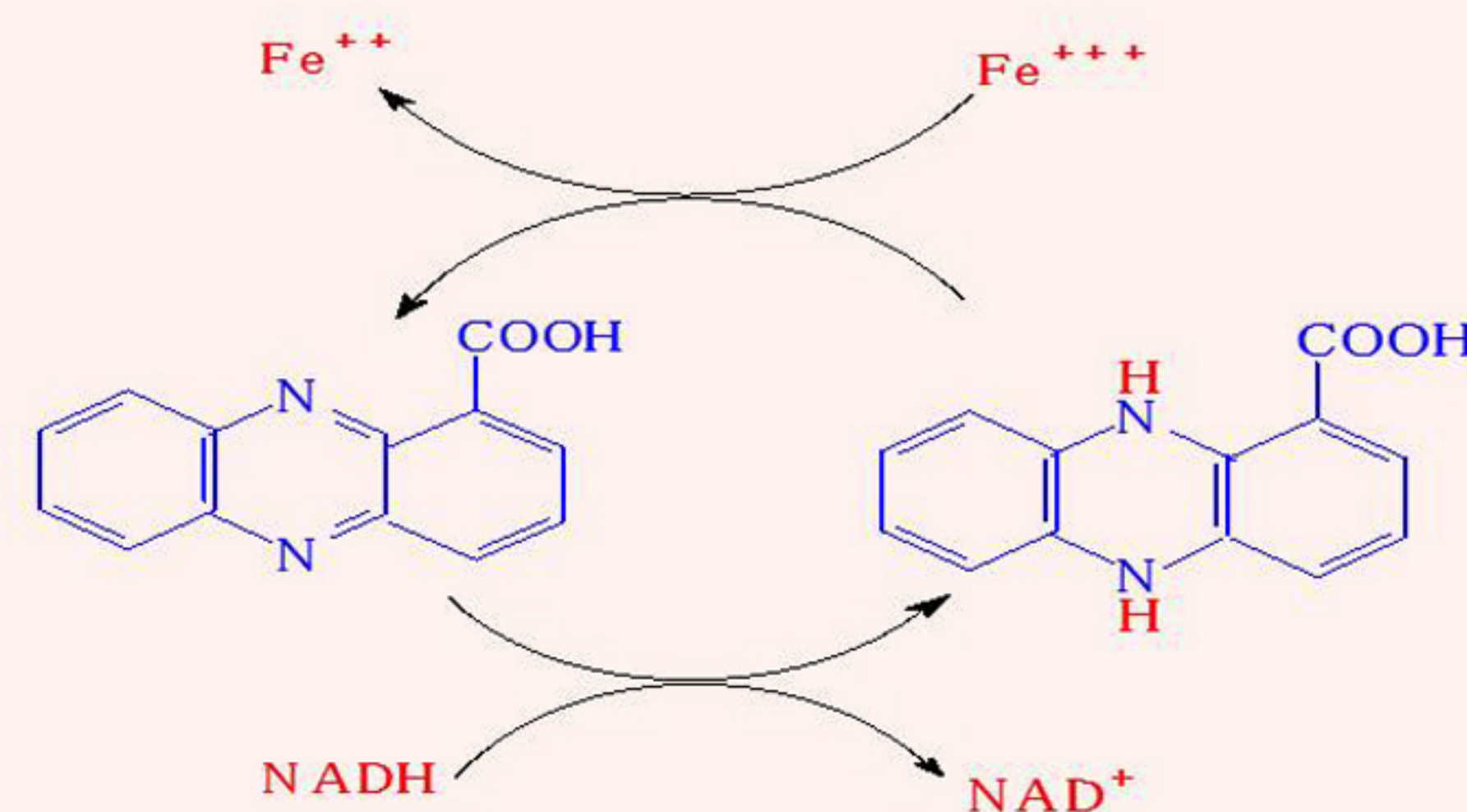
在建立水稻白叶枯病菌蛋白质组学数据库及申嗪霉素对糖代谢干扰的研究基础上, 初步探明新型抗生素申嗪霉素对水稻白叶枯病菌的作用机制。



水稻白叶枯病菌蛋白质组图谱 (24cm胶条, pH3-10)



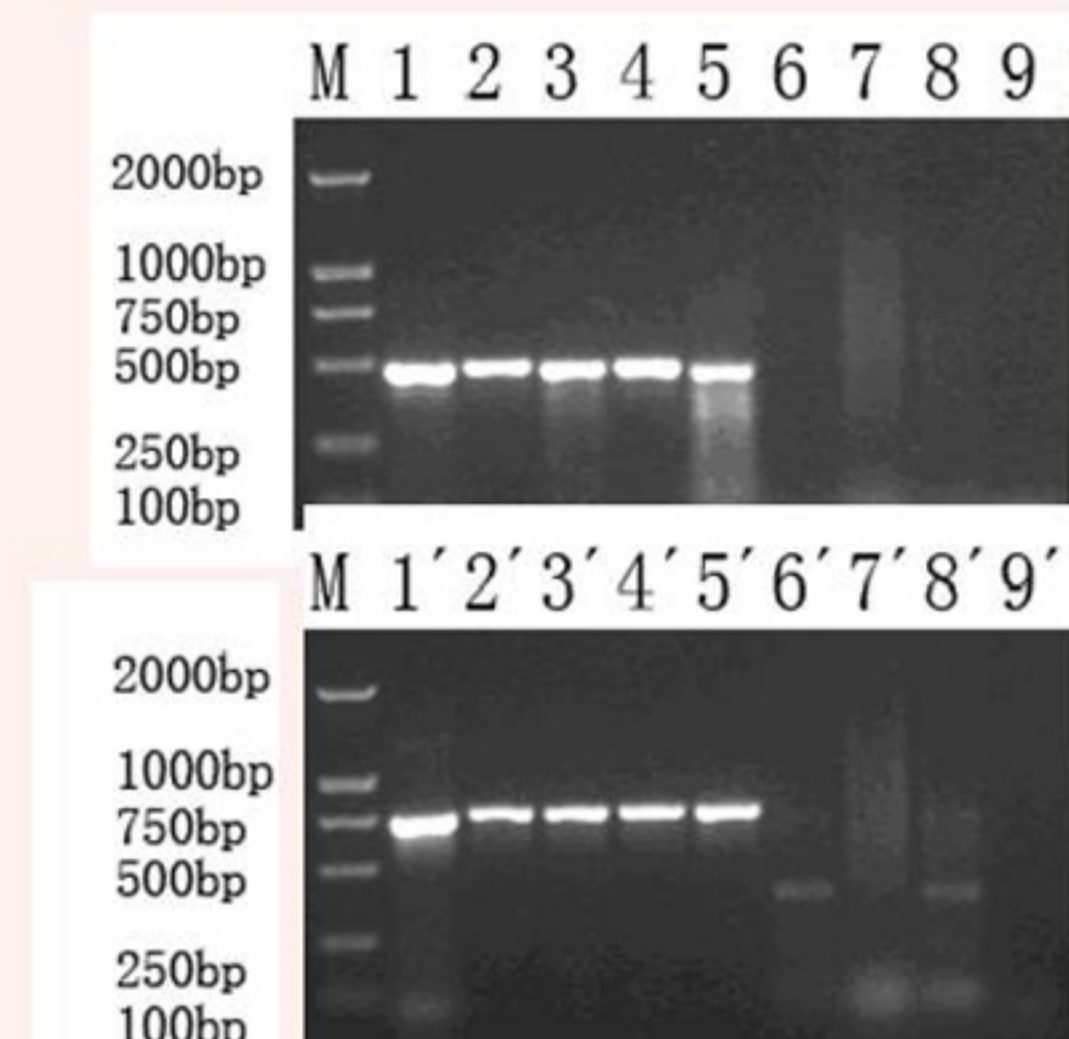
628个蛋白点的鉴定及功能分布



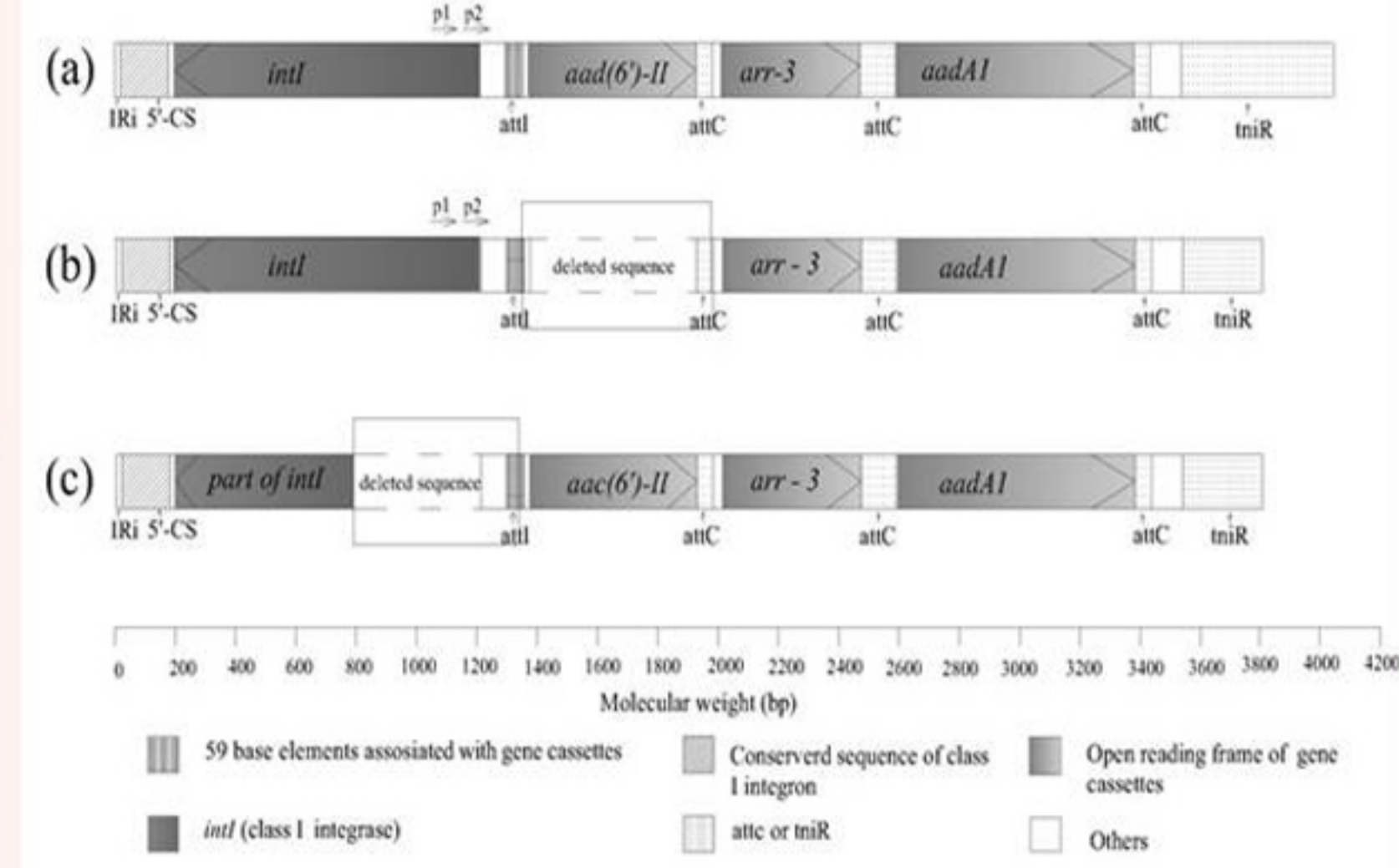
申嗪霉素干扰细菌细胞的NADH氧化还原平衡及Fe²⁺的利用。

水稻白叶枯病菌对两种药剂的抗药性机制

1、首次发现整合子及*aadA1*基因的存在是水稻白叶枯病菌对抗生素产生抗药性的原因。

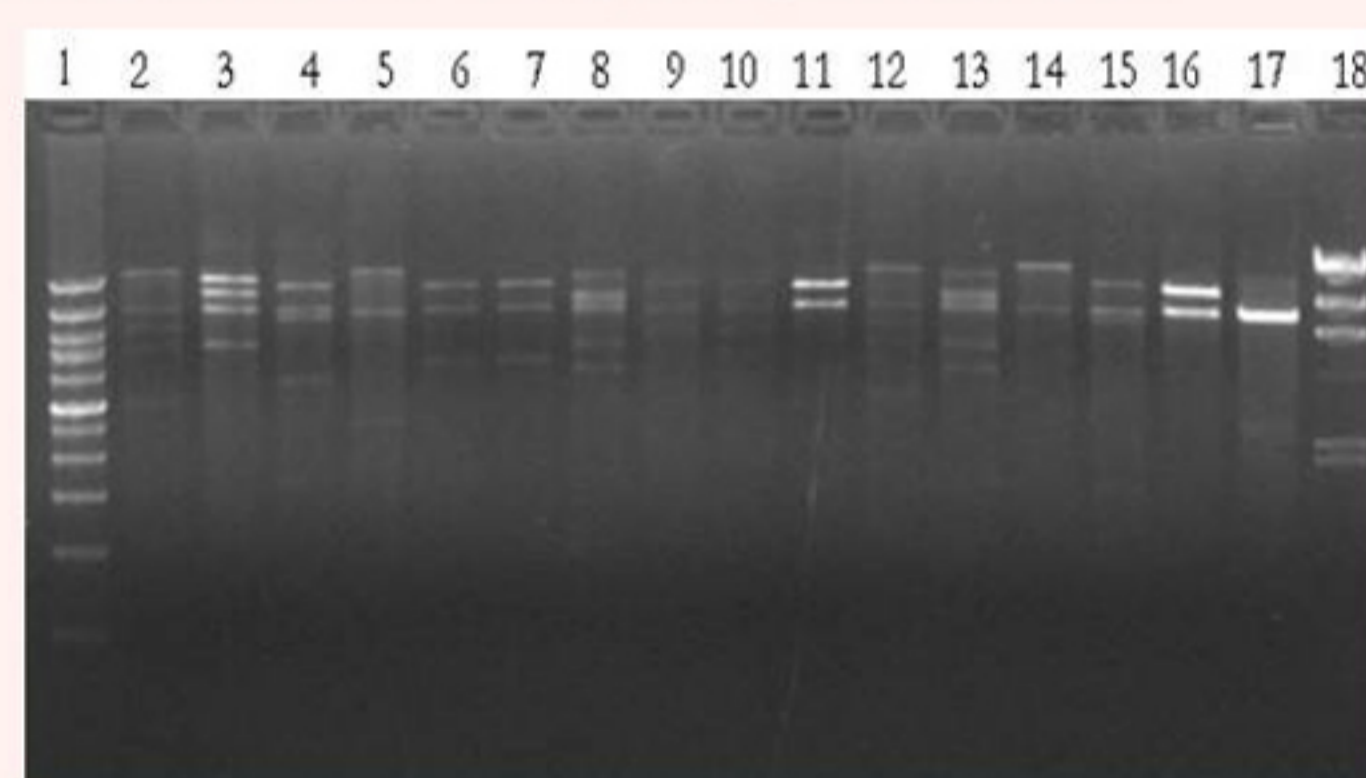


链霉素抗性与*aadA1*基因的存在有关

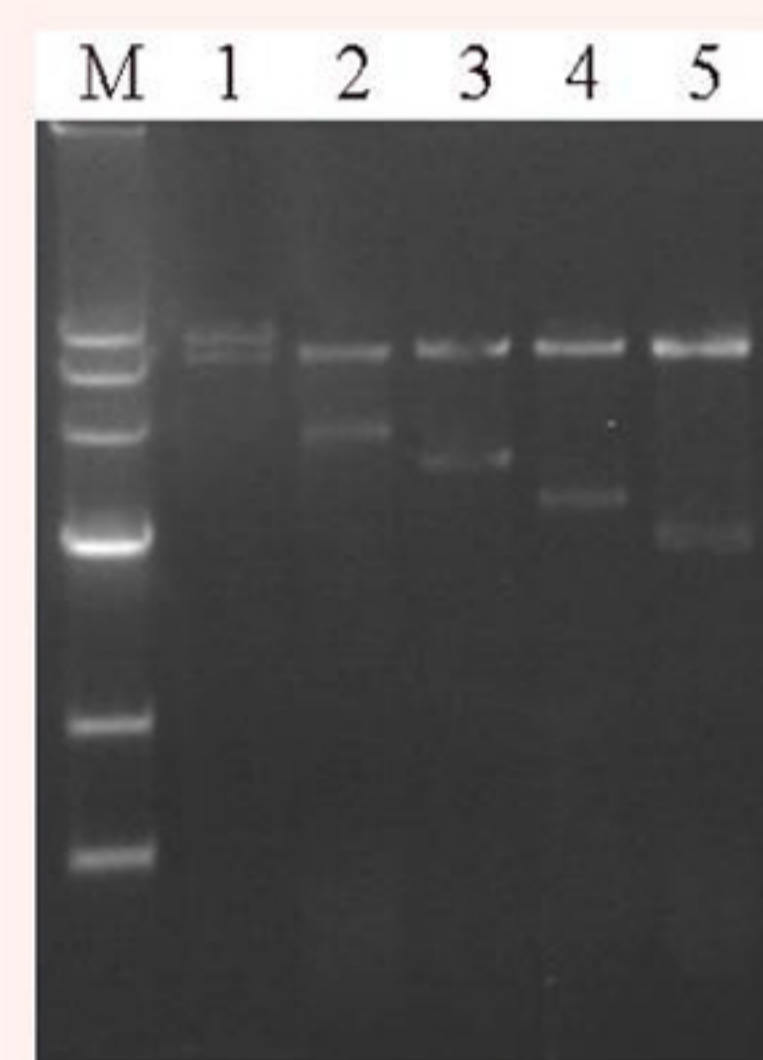
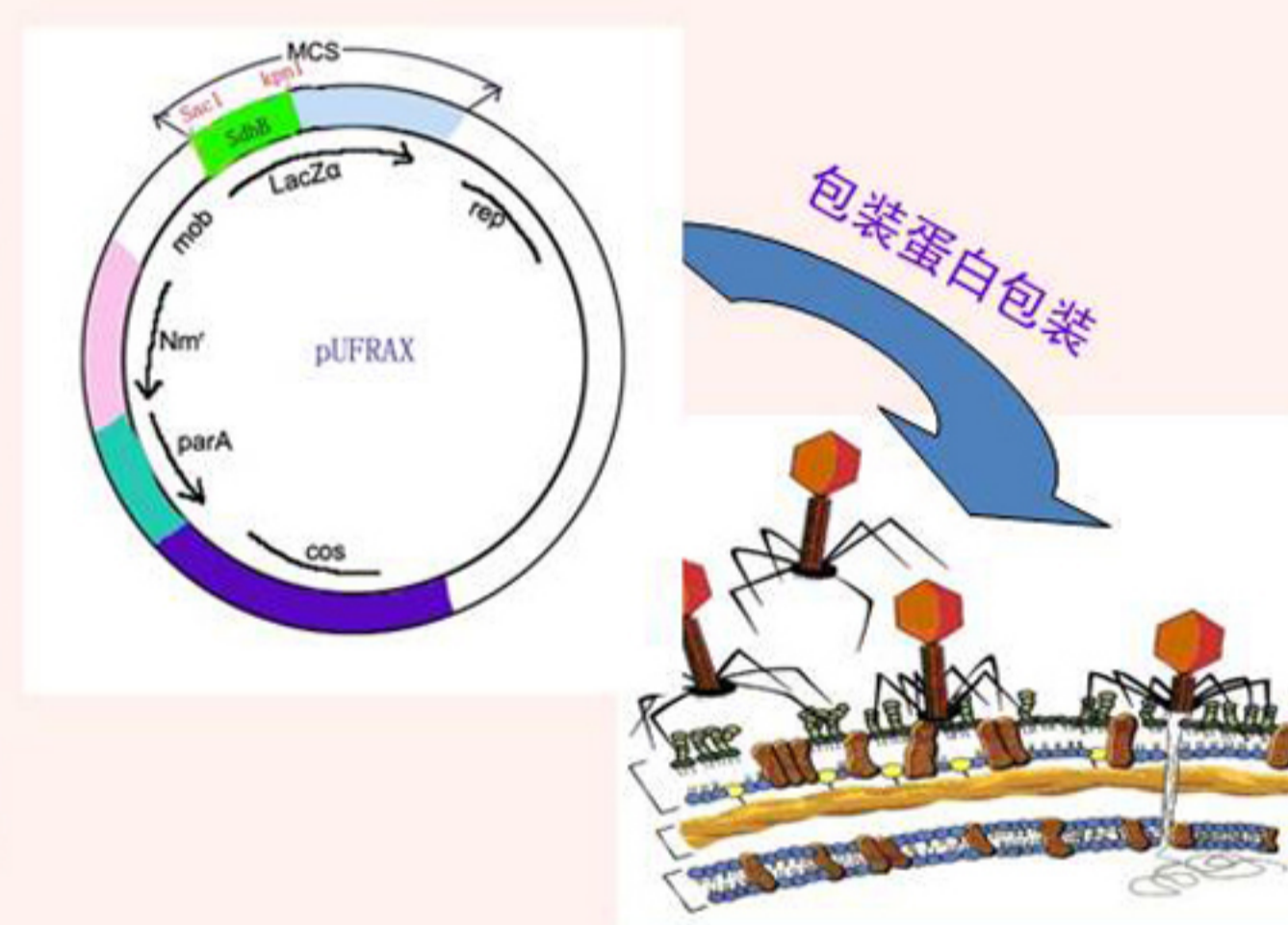


发现整合子的基因排序决定对不同抗生素的抗性谱

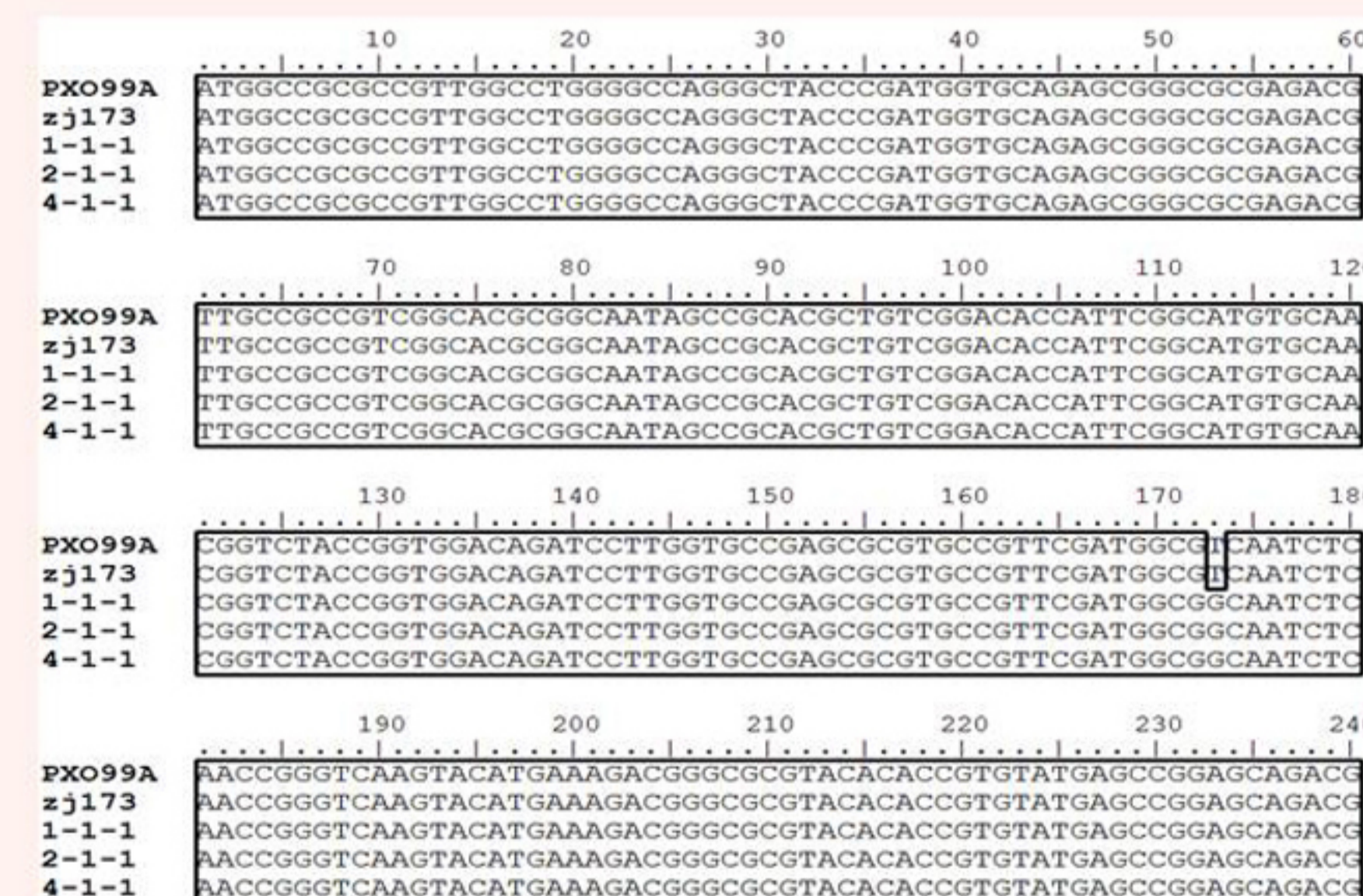
2、构建了水稻白叶枯病菌噻枯唑抗性菌株2-1-1的粘粒基因组文库, 将1200个转化子通过两亲交配转染白叶枯病菌野生敏感菌株PXO99, 通过活体筛选发现结合子518表现抗药性, 再通过亚克隆发现*Chp*基因一个碱基发生突变, 引起了氨基酸变化 (Val变成Gly), 可能是水稻白叶枯病菌对噻枯唑产生抗药性的原因。



噻枯唑抗性菌株2-1-1文库克隆质粒酶切检测



转化子518亚克隆



敏感与抗性菌株*Chp*基因碱基比对



杀菌剂生物学实验室

Laboratory of Fungicide Biology

抗药性治理及推广应用研究

小麦赤霉病抗药性治理技术及推广应用

针对小麦赤霉病菌抗药性群体发展不同阶段的抗药性治理，分别研发出38%多福酮、30%戊福和25%氰烯菌酯，实现产业化应用。

劲护® (25%氰烯菌酯悬浮剂) 防治小麦赤霉病

小麦赤霉病田间防效

30%戊福WP, 90克/亩, 2次

50%多菌灵SC, 90克/亩, 2次

对照未用药	氰烯菌酯
戊·福	戊福→多菌灵

干粒重↑12.34%

↑22.99%

↑28.95%

2014年小麦赤霉病示范推广现场会—荻港农场

油菜菌核病抗药性治理技术及推广应用

在抗药性机制及不同杀菌剂互作机制研究基础上，研发出替代多菌灵的油菜菌核病治理技术。其中研发出的50%福菌核（福美双+菌核净）和50%福菌脲（福美双+异菌脲）在江苏和安徽大面积应用，防效达75%-85%。

喷清水对照 (50公斤/亩)

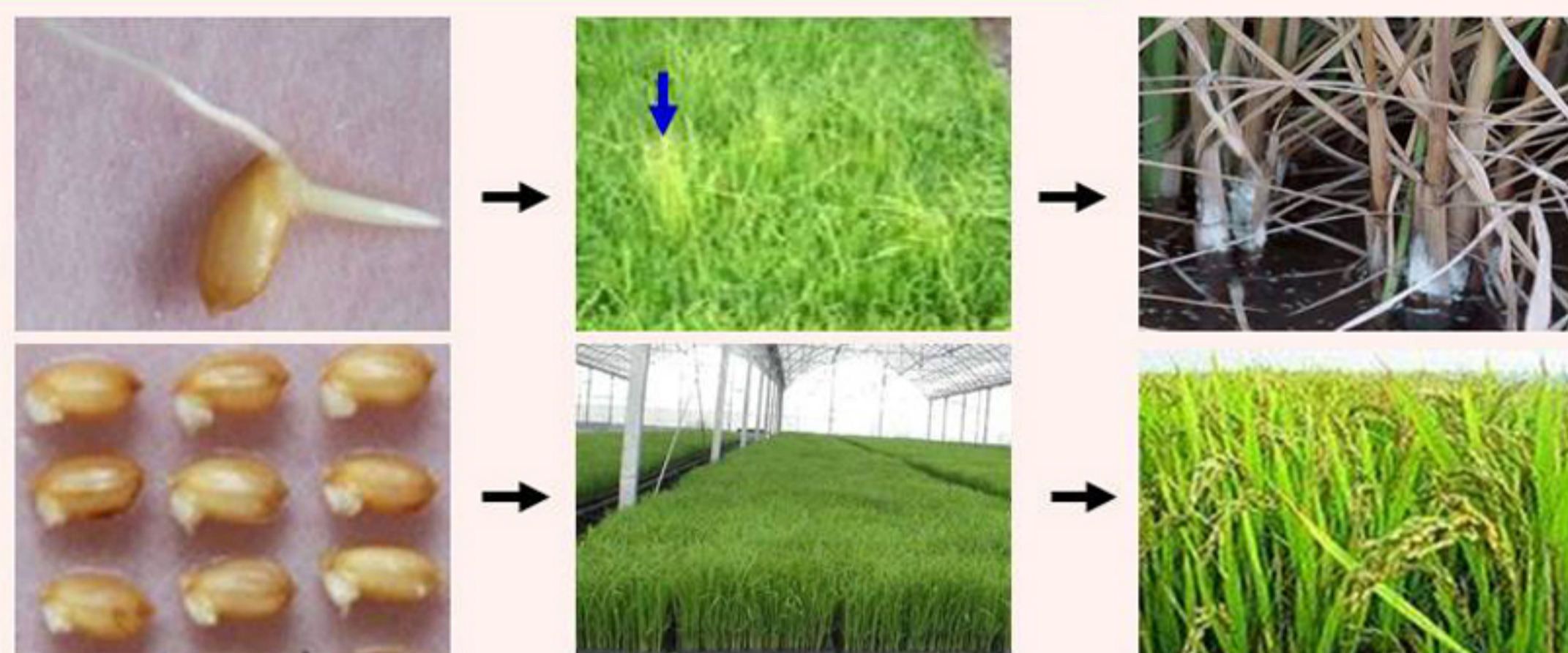
江苏省农业科技重大攻关项目“油菜菌核病无公害综合防治关键技术研究与开发(BE2006304)”试验区

承担单位：南京农业大学 江苏省农科院 姜堰市农技推广中心

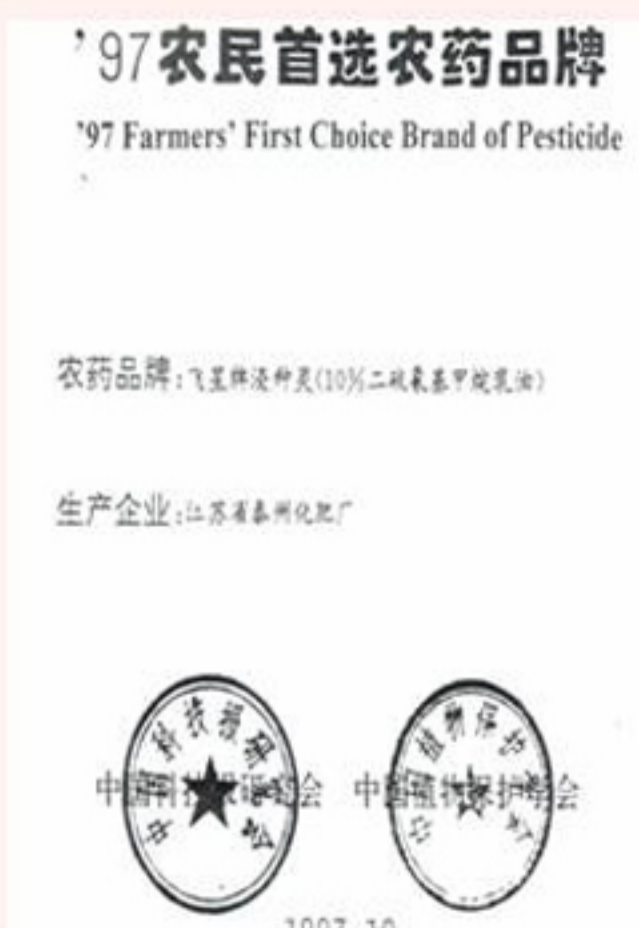


水稻恶苗病抗药性治理技术及推广应用

(1) 在探明水稻恶苗病菌侵染致病机制的基础上，研发出控温催芽至露白播种的控病技术，减轻发病95%以上。



(2) 从工业消毒剂中筛选、研发出“二硫氰基甲烷”（浸种灵、浸丰）特高效、超广谱杀菌剂，每亩用药0.1克，防治水稻恶苗病和干尖线虫病的效果可达95%-100%，并具有使用方法简便安全、无残留、无抗药性风险的突出优点，在全国累计应用4亿多亩。





杀菌剂生物学实验室

Laboratory of Fungicide Biology

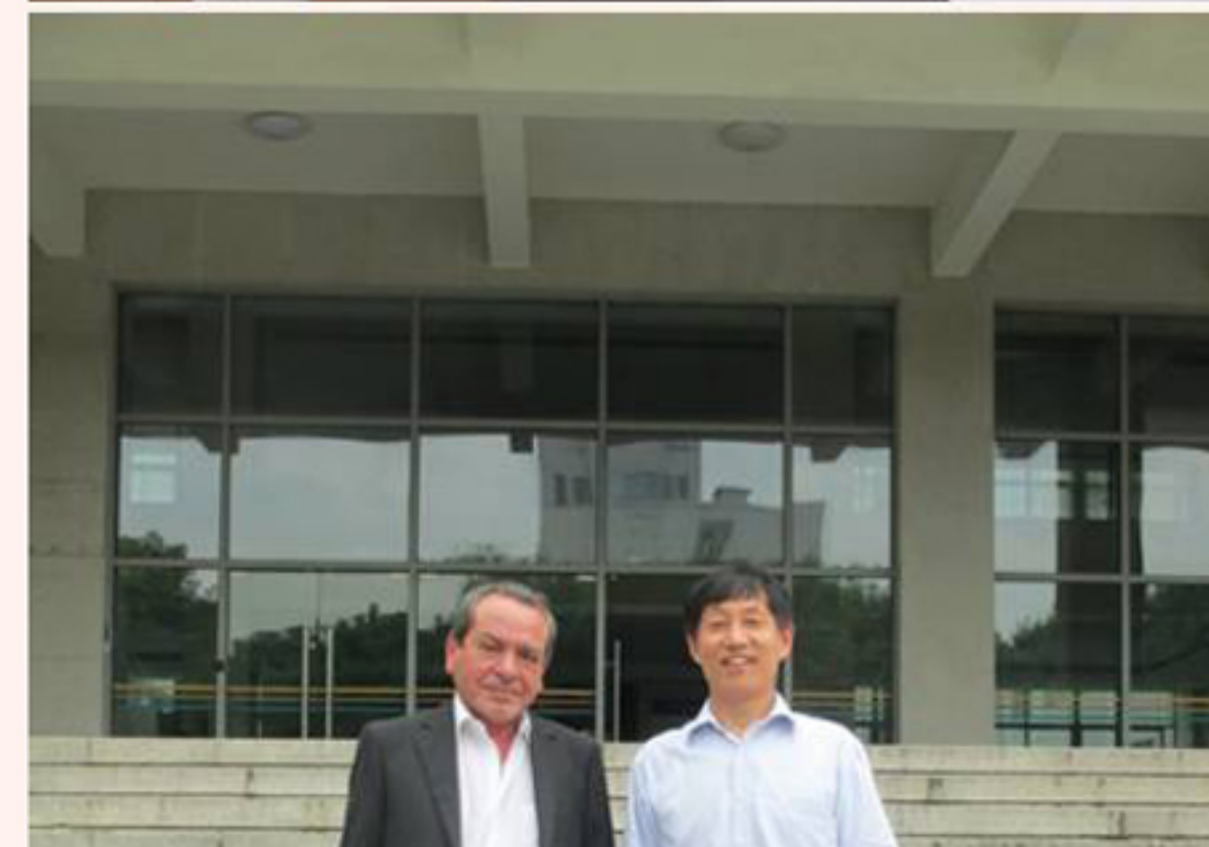
承担的主要科研项目

1. 小麦赤霉病菌无公害药物新靶标的功能及其与药剂分子互作机制, 国家973计划, 2012CB114002, 100万元, 2012.01-2016.12
2. 农作物重要病原菌抗药性监测及治理技术与示范, 农业部公益性行业(农业)科研专项, 201303023, 1791万元, 2013-2015
3. 油料作物菌核病综合防控技术与示范推广, 农业部公益性行业(农业)科研专项, 201103016, 240万元, 2011-2015
4. 小麦赤霉病流行预警及生物化学协同防控技术研发, 江苏省科技支撑计划, BE2013432, 200万元, 2013.7-2016.12
5. 申嗪霉素对水稻白叶枯病菌的药理学机制研究, 国家自然科学基金, 31272065, 80万元, 2013.1-2016.12
6. 杀菌剂生物活性评价与应用技术研发, 企业委托, 600万元, 2013.1-2017.12
7. 苯吡咯类杀菌剂咯菌腈对油菜菌核病菌双组分信号系统的调控机制研究, 国家自然科学基金, 31401764, 24万元, 2015.1-2017.12
8. 核盘菌响应调控因子RRG-1和RRG-2对PPFs和DCFs的药敏性调控机制研究, 江苏省自然科学基金, BK20140679, 19万元, 2014.7-2017.6
9. 新型杀菌剂氰烯菌酯的作用机理研究, 国家自然科学基金, 31201543, 23万元, 2013.1-2015.12
10. 重要病虫抗药性早期快速分子诊断技术研究, 国家863计划, 2012AA101502, 95万元, 2012.1-2015.12
11. 农作物重大病虫害防控关键共性技术研发, 国家科技支撑计划, 2012BAD19B01, 36万元, 2012.1-2016.12
12. 主要设施蔬菜两病两虫综合防控技术与示范, 江苏省农业科技自主创新资金项目, CX(14)2054, 40万元, 2015-2017
13. β_2 -微管蛋白基因(β_2 -tub)发生点突变导致亚洲镰孢菌对多菌灵抗药性菌株合成DON类毒素显著增强的分子机制, 国家自然科学基金面上项目, 31171880, 60万元, 2012-2015

主要代表性论文(近3年)

- Duan YB, *et al.* Scientific Reports, 2014, DOI:10.1038/srep07094.
- Duan YB, *et al.* PLoS ONE, 2014, 9: e111094.
- Zheng ZT, *et al.* Molecular Plant Pathology, 2014, 15: 488-499.
- Duan YB, *et al.* Journal of Pest Science, 2014, 87: 221-230.
- Peng D, *et al.* Pest Management Science, 2014, 70: 258-263.
- Gao T, *et al.* FEMS Microbiology Letters, 2014, 351: 42-50.
- Peng D, *et al.* Biological Control, 2014, 70: 28-34.
- Duan YB, *et al.* Australasian Plant Pathology, 2014, 43: 61-66.
- Wang Y, *et al.* Canadian Journal of Plant Pathology, 2014, 36: 354-359.
- Chen ZH, *et al.* FEMS Microbiology Letters, 2014, 357: 77-84.
- Zhang XK, *et al.* Pesticide Biochemistry and Physiology, 2014, 114: 72-74.
- Duan YB, *et al.* Molecular Plant Pathology, 2013, 14: 708-718.
- Xu Y, *et al.* PLoS ONE, 2013, 8: e55962.
- Hou YP, *et al.* Pesticide Biochemistry and Physiology, 2013, 107: 86-92.
- Hou YP, *et al.* Australasian Plant Pathology, 2013, 42: 73-78.
- Zheng ZT, *et al.* FEMS Microbiology Letters, 2013, 349: 88-98.
- Duan YB, *et al.* Pesticide Biochemistry and Physiology, 2013, 106: 61-67.
- Liu SM, *et al.* Pest Management Science, 2013, 69: 582-588.
- Xu S, *et al.* BBA-Proteins and Proteomics, 2013, 1834: 1660-1670.
- Zhu XF, *et al.* Crop Protection, 2013, 47: 24-29.
- Zhang LG, *et al.* Physiological & Molecular Plant Pathology, 2013, 84: 53-60.
- Ge CY, *et al.* Journal of Phytopathology, 2013, 161: 800-806.
- Qiu, J., *et al.* Pest Management Science, 2012, 68: 1191-1198.
- Duan, Y., *et al.* Pesticide Biochemistry and Physiology, 2012, 103: 101-107.
- Qiu, J., *et al.* Pest Management Science, 2011, 67: 191-198.
- Hou, Y., *et al.* Pest Management Science, 2011, 67: 1124-1128.
- Huang, P., *et al.* Nature Biotechnology, 2011, 29: 699-700.
- Tang, Z., *et al.* Crop Protection, 2011, 30: 354-359.
- Kuang, J., *et al.* Crop Protection, 2011, 30: 876-882.
- Zhang, Y., *et al.* Phytoparasitica, 2011, 39: 393-401.
- Yu, W., *et al.* Journal of Pesticide Science, 2011, 36: 385-391.

国际合作与交流



2006年中-德农业病虫害抗药性高级学术研讨会
2006' Sino-German Workshop on Pesticide Resistance 2006.10.30 中国 南京





南京农业大学 植物保护学院
Nanjing Agricultural University

杀菌剂生物学实验室

Laboratory of Fungicide Biology

主要研究成果

获得国家科技进步二等奖2项，省部级科技进步及技术发明二等奖3项；国家技术发明专利10余项；出版病虫抗药性专辑2册、学术会议论文集9卷；参编教材和著作6部。在国内外学术期刊发表论文200多篇，其中在Nature Biotechnology、Molecular Plant-Microbe Interaction、Scientific Reports、Molecular Plant Pathology、Pest Management Science等国际学术期刊上发表SCI论文80多篇。



研究生培养

近17年来，已培养博士研究生28人，硕士研究生45人。现有在读研究生34人，其中博士研究生10人。有多名在读研究生前往美国和德国合作培养或参加国际学术会议。多篇论文被评为江苏省和南京农业大学优秀博士学位论文和优秀硕士学位论文。已毕业博士生均在高校和科研院所工作，硕士生毕业生在企事业单位从事专业工作，大多数成为业务骨干和领导。

