

小麦纹枯病菌对三唑酮不同敏感性菌株的生物学特性及对不同杀菌剂的敏感性

徐建强^{1*} 赵建江² 胡雪涵¹ 吴亚云¹ 杨改凤¹ 范倩倩¹

(1. 河南科技大学林学院, 洛阳 471003; 2. 河北省农林科学院植物保护研究所, 保定 071000)

摘要: 为预测小麦纹枯病菌对三唑酮抗药性的发展趋势, 采用菌丝生长速率法测定了2013年分离自河南省16个地市的98株菌株对三唑酮的敏感性, 比较不同敏感性菌株的生物学性状差异, 并分析了其中22株菌株对其它10种杀菌剂的敏感性。结果表明: 小麦纹枯病菌群体中已出现对三唑酮敏感性下降的菌株, 其中有90株菌对杀菌剂的敏感性属于正态分布, 以其 EC_{50} 均值1.91 $\mu\text{g/mL}$ 作为小麦纹枯病菌对三唑酮的敏感性基线。敏感菌株菌丝生长速度较快, 可达8.50~12.86 mm/d, 菌核产量较多, 为35.80~42.90 mg/皿, 生存适合度较高; 敏感性下降及抗性菌株的致病性及菌核萌发等都未发生改变, 但菌丝生长速率仅为5.36~10.02 mm/d, 菌核产量为9.00~36.90 mg/皿, 均下降明显, 生存适合度降低; 低抗菌株与敏感菌株在菌落形态上相同, 但菌丝分枝数增多且分枝菌丝变短。三唑酮对小麦纹枯病菌的毒力较小, EC_{50} 大于其它10种杀菌剂; 戊唑醇、氟环唑、烯唑醇、咯菌腈和噻呋酰胺的毒力均较大, 其 $EC_{50} \leq 0.10 \mu\text{g/mL}$; 其余5种杀菌剂的 EC_{50} 在0.13~0.69 $\mu\text{g/mL}$ 之间; 小麦纹枯病菌对三唑酮的敏感性与其它10种杀菌剂间的决定系数为0.003~0.200, 存在微弱的正相关性, 表明在生产中这些杀菌剂可与三唑酮轮换或交替使用。

关键词: 小麦纹枯病菌; 三唑酮; 菌丝生长; 菌核萌发; 致病性

Biological characteristics of *Rhizoctonia cerealis* isolates with different sensitivities to triadimefon and their sensitivity to different fungicides

Xu Jianqiang^{1*} Zhao Jianjiang² Hu Xuehan¹ Wu Yayun¹ Yang Gaifeng¹ Fan Qianqian¹

(1. College of Forestry, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, Henan Province, China; 2. Plant Protection Institute, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Baoding 071000, Hebei Province, China)

Abstract: In order to forecast the resistance development of *Rhizoctonia cerealis* to triadimefon, the sensitivities of 98 isolates to triadimefon isolated in 2013 from 16 cities in Henan Province were determined by mycelial growth rate method; biological characteristics of the isolates with different sensitivities to triadimefon were studied, and the sensitivities of 22 isolates to ten other fungicides were also determined. The subpopulation with less sensitive to triadimefon was discovered in the tested isolates. The mean EC_{50} value of 1.91 $\mu\text{g/mL}$ for 90 isolates showed a unimodal curve distribution, which was treated as the sensitive baseline of *R. cerealis* to triadimefon. The sensitive isolates had higher survival fitness, which implied that their mycelia grew faster with 8.50–12.86 mm/d, and they could produce more sclerotia with 35.80–42.90 mg per dish. Both the mycelia growth rate (5.36–10.02 mm/d) and sclerotium dry weight (9.00–36.90 mg per dish) of slightly sensitive and resistant strains were lower, indicating that the resistant strains had lower survival fitness, though their pathogenicity and the sclerotium germi-

nation did not change. The number of hyphal tip branching of slightly resistant isolates was greater than that of sensitive isolates, but the length of the branched hypha was less than that of sensitive isolates. The EC_{50} value of triadimefon to *R. cerealis* was greater than those of ten other fungicides, suggesting that the virulence of triadimefon was weaker. The virulence of tebuconazole, epoxiconazole, diniconazole, fludioxonil and thifluzamide was stronger, as their EC_{50} values were less than or equal to 0.10 $\mu\text{g/mL}$. The EC_{50} value of five other fungicides varied from 0.13 $\mu\text{g/mL}$ to 0.69 $\mu\text{g/mL}$. Moreover, the determination coefficients existing between triadimefon and ten other fungicides ranged from 0.003 to 0.200, showing that there was a weak cross resistance and the ten fungicides could be used to control wheat sharp eyespot as an alternative of triadimefon.

Key words: *Rhizoctonia cerealis*; triadimefon; mycelial growth; sclerotinia germination; pathogenicity

小麦纹枯病又称小麦尖眼斑病,是一种世界性分布的土传真菌病害(Hamda et al., 2011a)。近年来该病害在豫、苏、皖、鲁、冀、陕等省冬小麦种植区发生普遍,已成为影响小麦高产、稳产的重大问题(李海燕等, 2015)。目前尽管有育种单位已获得稳定的小麦纹枯病抗源,但抗病品种较少(史建荣等, 2000),生产中控制该病害主要依靠药剂种子处理结合春季喷雾来进行化学防治。我国于20世纪70年代后期开始推广井冈霉素来防治小麦和水稻纹枯病,目前苏、皖、鲁3省的小麦纹枯病菌对井冈霉素仍较为敏感,尚未有抗药性菌株的出现(孙海燕等, 2011);但河南省已出现对井冈霉素敏感性下降的亚群体(徐建强等, 2017a)。

目前,三唑类杀菌剂如三唑酮、苯醚甲环唑及戊唑醇等已开始应用于小麦纹枯病的化学防治(Zhou & Jia, 2015)。三唑类杀菌剂是一种含有三氮唑的有机杂环类化合物,可抑制病菌麦角甾醇的生物合成,使真菌的细胞膜功能受到破坏,影响真菌菌丝或孢子的形成(徐建强等, 2016a)。由于该类杀菌剂具有广谱(对子囊菌、担子菌、有丝分裂孢子类等多种病原真菌有效)、高效(仅为福美类和代森类杀菌剂的1/10~1/5)、持效期长(叶面15~20 d、种子处理80 d左右、土壤处理100 d)、内吸输导性好等特点,不仅具有较强的预防和治疗作用,而且还有熏蒸和铲除作用,故在全球销量前10的杀菌剂中占了4席,分别为丙硫菌唑、氟环唑、戊唑醇和环唑醇(孙克, 2013)。三唑酮是拜耳公司开发的、在我国第一个商品化的三唑类杀菌剂,问世至今已有近30年的历史,其在植物和真菌体内转化为三唑醇而发挥作用,商品名为粉锈宁,对防治禾谷类作物白粉病和锈病有特效,同时可防治小麦纹枯病,生产中多通过种子包衣的方法施用(李铭东等, 2014)。随着三唑类等内吸性杀菌剂的大量使用和同类药剂的连续应用,

病菌对药剂的敏感性降低,或产生了不同程度的抗药性,化学防治效果下降明显(胡燕等, 2006)。徐建强等(2016b; 2017b, c)测定了河南省小麦纹枯病菌对三唑类杀菌剂的敏感性,结果显示病菌中存在着对三唑酮、苯醚甲环唑及烯唑醇不敏感的亚群体,但对戊唑醇及氟环唑均较为敏感。

杀菌剂抗药性是病菌定向选择的结果,但某些病菌对杀菌剂产生抗药性后会伴随着其生存适合度的下降,此时病菌抗药性便不会发展成为农业生产中的主要问题,故有必要研究抗药性菌株在生存适合度方面同敏感性菌株的差异(van den Bosch et al., 2014)。到目前为止尚未有小麦纹枯病菌对三唑酮抗药性菌株生存适合度的报道。为了预测小麦纹枯病菌对三唑酮抗药性的发展态势,本试验以田间分离的抗性菌株及敏感性下降菌株为材料,比较它们同敏感性菌株在菌丝生长、菌核产生及萌发、菌丝顶端分枝及菌落形态、致病性等方面的生物学性状差异和对其它杀菌剂敏感性间的相关性,以期明确三唑酮在河南省小麦纹枯病防治上继续应用的价值提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株及植物:2013年从河南省安阳、郑州、鹤壁、焦作、开封、漯河、洛阳、南阳、平顶山、濮阳、商丘、许昌、信阳、新乡、周口、驻马店共16个地市分离获得病菌343株,每个地市随机选取4~8株共98株菌株进行鉴定,并测定其对三唑酮的敏感性。供试小麦品种为豫麦49-198,购自洛阳市农林科学院。

培养基:马铃薯蔗糖琼脂(potato sugar agar, PSA)培养基:马铃薯200 g、蔗糖20 g、琼脂粉20 g、蒸馏水1 000 mL;马铃薯蔗糖(potato sugar, PS)培养液:PSA培养基中不添加琼脂粉;水琼脂培养基

(water agar, WA): 琼脂粉 20 g、蒸馏水 1 000 mL。

药剂: 95% 三唑酮(triadimefon)原药和 92% 烯唑醇(diniconazole)原药, 江苏建农农药化工有限公司; 97% 苯醚甲环唑(difenoconazole)和 97.9% 的咯菌腈(fludioxonil)原药, 先正达(中国)投资有限公司; 97% 戊唑醇(tebuconazole)原药, 广西田园生化股份有限公司; 98% 丙环唑(propiconazole)和 96.5% 氟环唑(epoxiconazole)原药, 江苏利民化工有限公司; 97% 噻呋酰胺(thifluzamide)原药, 江苏省镇江农药厂; 97% 氟酰胺原药(flutolanil), 江阴苏利化学有限公司; 62.5% 井冈霉素(jinggangmycin)原药, 浙江钱江生物化学股份有限公司; 97.6% 甲基立枯磷(tolclofos-methyl)原药, 江苏省东海农药厂。

仪器: SPX-250BSH-□型生化培养箱, 上海新苗医疗器械制造有限公司; XSP-8C 型光学显微镜, 上海光学六厂。

1.2 方法

1.2.1 小麦纹枯病菌对三唑酮的敏感性测定

采用菌丝生长速率法。将 98 株供试病菌在 PSA 平板上 25℃ 培养 3 d 后, 用打孔器在菌落边缘打取直径 5 mm 的菌饼, 菌丝面朝下接入含 0.625、1.25、2.5、5、10 和 20 $\mu\text{g/mL}$ 三唑酮系列浓度的 PSA 平板上, 每皿接种 1 个菌饼, 每处理重复 3 次, 25℃ 下培养 5 d 后采用十字交叉法测量菌落直径, 计算各浓度处理下杀菌剂对菌丝生长的抑制率, 并利用 DPS 6.55 软件中的数量型数据机值分析程序计算杀菌剂抑制菌丝生长的有效中浓度(EC_{50})。菌丝生长抑制率 = $[(\text{对照菌落直径} - \text{菌饼直径}) - (\text{处理菌落直径} - \text{菌饼直径})] / (\text{对照菌落直径} - \text{菌饼直径}) \times 100\%$ 。

根据三唑酮对 98 株菌的 EC_{50} 构建小麦纹枯病菌对三唑酮的敏感性频率分布图; 利用 DPS 6.55 软件进行 98 株病菌对三唑酮的敏感性频率分布的 Shapiro-Wilk 正态性检验, 将属于正态分布菌株的 EC_{50} 平均值作为小麦纹枯病菌对三唑酮的敏感性基线, 此部分菌株为敏感菌株; 位于正态分布右侧的为敏感性下降菌株, 位于敏感性频率分布图第 2 个峰的为低抗菌株(FAO, 1982)。

1.2.2 不同敏感性菌株的生物学性状测定

根据 1.2.1 中菌株对杀菌剂的敏感性, 本文选择了 5 个敏感性菌株、3 个敏感性下降菌株、2 个低抗菌株共 10 株菌株为试材, 其中抗性菌株的抗性指数为三唑酮对抗药性菌株的 EC_{50} 同敏感性基线的比值(FAO, 1982)。

菌丝生长速率: 在 PSA 平板上接入培养 5 d 的

直径 5 mm 小麦纹枯病菌菌饼, 25℃ 恒温培养箱中培养, 待菌落布满培养皿时, 采用十字交叉法测量菌落直径, 计算菌丝生长速率, 每个菌株 3 次重复。菌丝生长速率 = 菌落直径 / 菌落布满培养皿生长天数。

菌丝干重: 100 mL 三角瓶中加入 50 mL PS 培养液。从培养 5 d 的小麦纹枯病菌菌落边缘打取直径 5 mm 的菌饼, 每瓶接入 6 个菌饼, 置于 25℃ 恒温摇床, 150 r/min 摇培 7 d, 过滤, 收集菌丝, 烘干, 称重。每个处理 3 次重复。

菌核形成及萌发: 参照陈厚德等(2005)的方法在 PSA 平板上诱导菌核形成。在 PSA 平板上接入 1 个直径 5 mm 的菌饼, 置于 25℃ 恒温培养箱中黑暗培养 60 d, 直至产生黑褐色菌核; 收集每个平板上的菌核, 烘干称重, 计算每个培养皿中产生的菌核重量。参照沈会芳等(2002)方法在 WA 平板上进行菌核萌发试验。将 PSA 平板上产生的菌核挑出, 每皿取 3 粒大小基本一致的菌核, 放入 5% 次氯酸钠溶液中消毒 30 s, 防止菌核表面菌丝生长而影响试验结果, 消毒后的菌核用无菌水冲洗 3 次, 吸干水分, 转入 2% WA 平板上, 培养 2 d 后记录菌核萌发情况。

菌丝顶端分枝形态: 参照陈厚德等(2005)方法。在 PSA 平板上接入培养 5 d、直径 5 mm 的病菌菌饼, 同时在菌饼四周以 45 度角斜插入灭菌的盖玻片, 25℃ 恒温培养, 待菌丝长到盖玻片上后, 将盖玻片取出, 对盖玻片上的菌丝进行番红 O-KOH 染色, 置于显微镜下观察, 对观察到的菌丝顶端分枝形态进行拍照。

1.2.3 不同敏感性菌株的致病性

参考 Hamda et al. (2011b) 方法。将豫麦 49-198 的种子放入 70% 的酒精溶液中浸泡 1 min, 无菌水冲洗 3 次后放入铺有无菌滤纸的培养皿中, 并用无菌水湿润滤纸, 25℃ 保温培养 6 d, 用挑针从培养 3 d 后的 1.2.2 中所述 10 株不同敏感性菌株的菌落边缘挑取菌饼接种在幼苗的茎基部, 将接种后的小麦幼苗放置在塑料烧杯的湿润滤纸上, 每个容器放 5 株, 每个菌株 5 次重复, 在 25℃ 光照培养箱培养 10 d 后对幼苗茎秆基部的发病症状进行观察, 包括有无云纹状病斑及病斑大小等; 以接种 PSA 培养基的小麦幼苗作对照。

1.2.4 三唑酮与其它杀菌剂对病菌毒力间的相关性

三唑酮、甲基立枯磷、氟环唑原药预溶于丙酮中, 苯醚甲环唑、戊唑醇、丙环唑、烯唑醇、咯菌腈、噻呋酰胺及氟酰胺预溶于甲醇中, 井冈霉素预溶于灭菌超纯水中, 以上杀菌剂均配制成 $10^4 \mu\text{g/mL}$ 母液,

放于4℃冰箱中保存备用。

参照齐永志等(2014)方法进行。选取低抗菌株2株、敏感性下降菌株4株及敏感性菌株22株(从16个地市各自选取1~2株),在PSA平板上25℃培养3 d后,用打孔器在菌落边缘打取直径5 mm的菌饼,菌丝面朝下接入含系列浓度杀菌剂的PSA平板上,其中苯醚甲环唑为0.025、0.05、0.1、0.5、2.5、5 μg/mL,戊唑醇为0.003、0.005、0.01、0.03、0.05、0.1 μg/mL,丙环唑为0.025、0.05、0.1、0.5、2.5、5 μg/mL,氟环唑及烯唑醇为0.03125、0.0625、0.125、0.25、0.5、1 μg/mL,咯菌腈为0.01、0.02、0.03、0.05、0.1、0.2 μg/mL,噻呋酰胺为0.03125、0.0625、0.125、0.25、0.5、1 μg/mL;氟酰胺为0.1、0.2、0.3、0.4、0.6、0.8 μg/mL;井冈霉素为0.15、0.2、0.25、0.35、0.5、1 μg/mL;甲基立枯磷为0.035、0.065、0.1、0.2、0.3、0.5 μg/mL。每皿接种1个菌饼,每处理3次重复,以不含杀菌剂的PSA平板上生长的菌落为对照,25℃下培养5 d后采用十字交叉法测量菌落直径,计算各浓度处理下杀菌剂对菌丝生长的抑制率,并利用DPS 6.55软件中数量型数据机值分析程序计算 EC_{50} 。将三唑酮对菌株的 EC_{50} 作为 x 轴,其它杀菌剂对菌株的 EC_{50} 为 y 轴,进行线性回归分析,求出线性回归方程 $y=bx+a$,根据决定系数(R^2)、 b 值及 F 检验的显著水平(P),分析三唑酮与其它杀菌剂对纹枯病菌毒力之间的关系,当 $P<0.05$ 时, b 值为正,说明2种杀菌剂间存在正相关性, b 值为负,说明2种杀菌剂间存在负相关性, R^2 越大,相关性越强;当 $P>0.05$ 时,说明2种杀菌剂间无相关性。

1.3 数据分析

采用DPS 6.55软件对试验数据进行分析,并求出线性回归方程、相关系数 R 及 EC_{50} ,并利用最小显著差数(LSD)法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 河南省小麦纹枯病菌对三唑酮的敏感性

Shapiro-Wilk 正态性检验结果表明,98株小麦纹枯病菌对三唑酮的敏感性不符合正态分布($W=0.94$, $P<0.05$),表明小麦纹枯病菌对三唑酮的敏感性已出现分化,生产中已有敏感性下降的亚群体。虽然有8.16%的菌株对三唑酮的敏感性出现分化(8株),但仍有91.84%的菌株(90株)对三唑酮的敏感性属于正态分布($W=0.97$, $P=0.0538$),其 EC_{50} 在0.38~3.52 μg/mL之间,敏感性基线为 1.91 ± 0.76 μg/mL;有6个菌株的 EC_{50} 处于正态性分布图的右侧(EC_{50} 为3.53~4.00 μg/mL),为敏感性下降菌株;有2个菌

株构成敏感性频率分布的第2个峰,为低抗菌株(图1),其抗性倍数分别为2.78和3.11。为了进一步比较不同敏感性菌株生物学性状的差异,选取了5个敏感性菌株(HB-4、SY-14、ZM-10、AY-14、ND-5)、3个敏感性下降菌株(XY-1、XC-14、SM-16)、2个低抗菌株(SM-11、SY-13)进行后续研究(表1)。

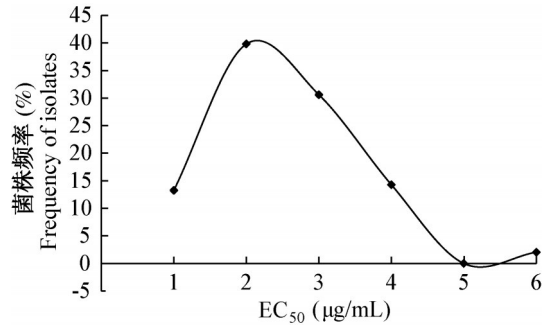


图1 小麦纹枯病菌对三唑酮的敏感性频率分布

Fig. 1 Frequency distribution of *Rhizoctonia cerealis* populations to triadimefon

2.2 对三唑酮不同敏感性菌株的生物学性状

2.2.1 菌丝生长速率及菌丝干重

随着菌株对三唑酮的敏感性下降,菌株的生长速率较敏感性菌株变小,敏感性下降菌株及低抗菌株的生长速率同敏感性菌株差异显著;敏感性菌株的生长速率为8.50~12.86 mm/d,其中生长最快的为菌株SY-14;而敏感性下降菌株及低抗菌株的菌丝生长速率都很小,生长最慢的为菌株SY-13(表2),仅为5.36 mm/d。在液体摇培时,敏感性菌株ND-5的菌丝干重最大,每瓶可达123.00 mg,最小的为低抗菌株SM-11,每瓶干重仅为97.30 mg,但不同类型菌株间液体摇培后的菌丝干重差别不大(表2)。

2.2.2 菌核形成和萌发

在PSA培养基上培养时,敏感性菌株中除HB-4及SY-14外,其余3个菌株产生的菌核均较多,其中ZM-10所产菌核量最多,为42.90 mg/皿,其次为AY-14和ND-5,分别为42.00、35.80 mg/皿,均显著高于其它菌株;敏感性下降菌株中XY-1产生的菌核量同敏感性菌株差异不显著,为36.90 mg/皿,但其它2株产生的菌核量较少,分别为25.40、31.70 mg/皿;低抗菌株产生的菌核量显著低于敏感性菌株及敏感性下降菌株,菌株SM-11及SY-13的菌核量仅为14.30、9.00 mg/皿(表3)。除敏感性菌株HB-4及SY-14外,其它8株菌株产生的菌核的萌发率均达到100.00%。菌株HB-4和SY-14有较高的生长速率,其中SY-14生长速率最大,可能导致其在相同培养时间内菌丝

生长最快,但形成菌核较少,且形成的菌核成熟度不够,致使菌核产生量及萌发率都不高。

表1 供试菌株对三唑酮的敏感性
Table 1 The sensitivities of tested isolates to triadimefon

菌株 Isolate	来源 Source	毒力回归方程 Regression equation	相关系数R Correlation coefficient	EC ₅₀ (95% CL) (μg/mL)	敏感性类型 Sensitivity type	抗性指数 Resistance index
HB-4	鹤壁市浚县 Xun County, Hebi City	y=0.6590x+5.2776	0.9703	0.38 (-0.10-0.80)	S	-
SY-14	商丘市虞城县 Yucheng County, Shangqiu City	y=1.1492x+5.2090	0.9881	0.66 (-0.05-0.90)	S	-
AY-14	安阳市安阳县 Anyang County, Anyang City	y=1.1808x+4.6425	0.9888	2.01 (0.39-2.44)	S	-
ZM-10	郑州市中牟县 Zhongmou County, Zhengzhou City	y=1.0577x+4.6520	0.9919	2.13 (0.40-2.51)	S	-
ND-5	南阳市邓州市 Dengzhou City, Nanyang City	y=1.1314x+4.6581	0.9931	2.01 (0.37-2.33)	S	-
XC-14	许昌市魏都区 Weidu District, Xuchang City	y=0.9261x+4.4536	0.9907	3.89 (0.66-4.53)	LS	-
XY-1	信阳市固始县 Gushi County, Xinyang City	y=1.3840x+4.2032	0.9607	3.76 (0.72-5.27)	LS	-
SM-16	商丘市民权县 Minquan County, Shangqiu City	y=0.8891x+4.4934	0.9902	3.71 (0.64-4.37)	LS	-
SM-11	商丘市民权县 Minquan County, Shangqiu City	y=1.3412x+4.0284	0.9858	5.30 (0.82-6.53)	LR	2.78
SY-13	商丘市虞城县 Yucheng County, Shangqiu City	y=1.1373x+4.1210	0.9911	5.93 (0.84-6.96)	LR	3.11

S: 敏感性菌株; LS: 敏感性下降菌株; LR: 低抗菌株。S: Sensitive; LS: slightly sensitive; LR: slightly resistant.

表2 小麦纹枯病菌对三唑酮不同敏感性菌株的生长情况
Table 2 Growth characteristics of *Rhizoctonia cerealis* isolates with different sensitivities to triadimefon

菌株 Isolate	菌丝生长速率 Hyphal growth rate (mm/d)	菌丝干重 (mg/瓶) Dry weight of mycelium (mg/bottle)	菌核 Sclerotia	
			干重 (mg/皿) Dry yield (mg/dish)	萌发率 Germination rate (%)
HB-4	11.07±0.27 c	114.10±6.40 ab	0.80±0.20 e	88.89
SY-14	12.86±0.27 a	117.70±16.00 ab	1.00±0.30 e	88.89
AY-14	11.69±0.25 b	103.80±8.20 ab	42.00±3.80 a	100.00
ZM-10	8.50±0.61 f	111.60±17.30 ab	42.90±4.80 a	100.00
ND-5	10.62±0.27 d	123.00±7.00 a	35.80±6.40 ab	100.00
XC-14	8.75±0.22 f	98.80±13.30 ab	25.40±9.70 c	100.00
XY-1	10.02±0.35 e	112.60±12.80 ab	36.90±5.00 ab	100.00
SM-16	7.23±0.35 g	114.00±25.10 ab	31.70±5.00 bc	100.00
SM-11	7.07±0.12 g	97.30±3.00 b	14.30±5.60 d	100.00
SY-13	5.36±0.15 h	111.90±22.30 ab	9.00±7.20 de	100.00

表中数据为平均数±标准差。同列数据后不同字母表示经LSD法检验在P<0.05水平差异显著。Data are mean±SD. Different letters in the same column indicate significant difference at P<0.05 by LSD test.

2.2.3 菌丝顶端分枝和菌落形态 沿着一个方向向前延伸,顶端分枝少,分枝呈锐角, 小麦纹枯病菌在PSA平板上的菌丝纤细直长, 二次分枝发生晚,对生分枝少,菌丝顶端不发生弯曲;

相较而言,低抗菌株SY-13分枝数较敏感性菌株HB-4和ZM-10多,但分枝菌丝短(图2-A~C),这导致其菌落生长速率较低(表3)。在PSA平板上培养时,菌落沿水平面生长,呈中心放射状,菌落中央菌丝隆起,边缘菌丝稀疏,呈放射状向外生长(图2-D)。

2.2.4 不同敏感性菌株的致病性

室内离体致病性测定中,敏感性菌株HB-4及ZM-10、敏感性下降菌株XY-1及低抗菌株SY-13在小麦幼苗上均可造成典型的眼状病斑,表明其都具有很强的致病力(图2-E)。

2.3 三唑酮与其它10种杀菌剂毒力间的相关性

戊唑醇、氟环唑、烯唑醇、咯菌腈和噻呋酰胺5种杀菌剂对小麦纹枯病菌的毒力均较大, $EC_{50} \leq 0.10 \mu\text{g/mL}$;甲基立枯磷、氟酰胺及井冈霉素的毒力居中, EC_{50} 分别为0.13、0.28、0.43 $\mu\text{g/mL}$;而苯醚甲

环唑及丙环唑在10种杀菌剂中毒力较小, EC_{50} 分别为0.66 $\mu\text{g/mL}$ 和0.69 $\mu\text{g/mL}$ (表3)。三唑酮对22株小麦纹枯病菌的 EC_{50} 为2.25 $\mu\text{g/mL}$ 。6种三唑类杀菌剂对病菌的毒力从大到小为戊唑醇、氟环唑、烯唑醇、苯醚甲环唑、丙环唑及三唑酮,其中三唑酮的毒力最弱, EC_{50} 分别为戊唑醇、氟环唑、烯唑醇、苯醚甲环唑及丙环唑的118.17、26.19、22.66、3.42、3.27倍。

关于 EC_{50} 的线性回归分析结果表明,菌株对三唑酮的敏感性与其对苯醚甲环唑、戊唑醇、丙环唑、氟环唑、烯唑醇、咯菌腈、噻呋酰胺、氟酰胺、井冈霉素及甲基立枯磷的决定系数分别为0.009、0.163、0.141、0.139、0.200、0.135、0.003、0.059、0.008和0.116, F 检验中 P 值均小于0.05,且回归方程中的 b 值均为正值,说明小麦纹枯病菌对三唑酮与对这10种杀菌剂间的敏感性存在正相关性,但相关性均较弱(表3)。

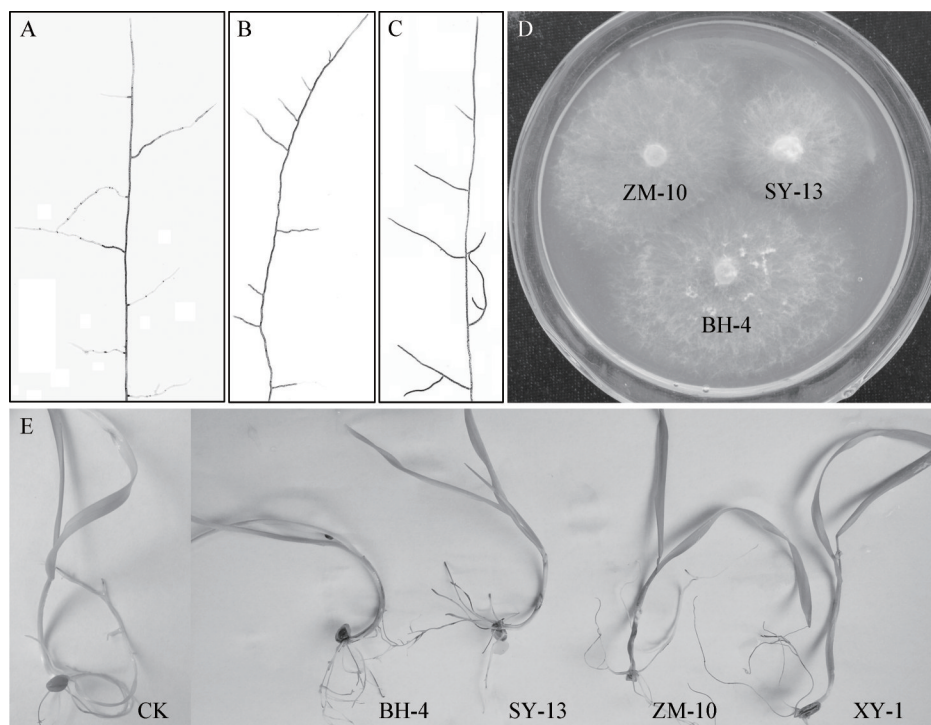


图2 小麦纹枯病菌菌丝顶端分枝、菌落形态及致病性

Fig. 2 Characteristics of hyphal tip branching, colony and pathogenicity of *Rhizoctonia cerealis*

A~C: HB-4、SY-13及ZM-10的菌丝顶端分枝形态(200 $\times$); D: 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养4 d后的菌落形态; E: 菌株在小麦幼苗上的致病性。A, B and C: Hyphal tip branching shape of HB-4, SY-13 and ZM-10 on PSA medium, respectively (200 $\times$); D: colony of HB-4, SY-13 and ZM-10 on PSA medium after incubation at 25 $^{\circ}\text{C}$ for 4 d; E: pathogenicity of different isolates on wheat seedlings.

3 讨论

刘英华等(2003)发现经杀菌剂驯化获得的戊唑醇抗性菌株菌丝生长速率慢于亲本菌株,菌丝干重也小于亲本菌株,菌核出现和形成时间较亲本菌株有延迟现象,菌核重量则大于亲本菌株。齐永志等

(2014)发现经室内紫外诱变及杀菌剂驯化获得的纹枯病菌噻呋酰胺抗性菌株在菌丝干重、菌核形成数量和菌核干重方面均明显低于亲本菌株。本研究结果表明,小麦纹枯病菌三唑酮敏感性菌株菌丝生长速度较快,且其在培养基上产生的菌核数较多,在自然界的生存适合度较高;敏感性下降及抗性菌株尽

管在致病性及菌核萌发方面未发生改变,但其菌丝生长速率及菌核产量明显下降,表明其生存适合度降低;而敏感性菌株SY-14及HB-4在菌核产生量及菌核萌发率方面都较其它菌株小,这可能是由于菌丝生长速率较大而延迟了菌核形成及成熟的时间,如果延迟培养时间,则2个菌株产生的菌核量会增加,成熟度也会提高。本试验部分结果同上述研究结果有差异,除了杀菌剂及菌株自身生长特性外,还

可能是由于上述二者是杀菌剂驯化或紫外诱导获得的抗性菌株,而本试验比较的不同敏感性菌株均来自田间,表明抗药性的产生可导致小麦纹枯病菌生存适合度降低,这可能是三唑酮连续应用多年而抗药性发展缓慢的原因。三唑酮依然可以应用于河南省小麦纹枯病的防治,但由于已监测到抗药性菌株,生产中有必要持续监测小麦纹枯病菌对三唑酮的敏感性变化,以防治小麦纹枯病菌抗药性群体的扩散。

表3 小麦纹枯病菌对三唑酮与对其它10种杀菌剂敏感性间的相关性

Table 3 Relationships between sensitivity of *Rhizoctonia cerealis* to triadimefon and other nine fungicides

药剂 Fungicide	EC ₅₀ (μg/mL)	回归方程 Regression equation	决定系数 R ² Determination coefficient	P
苯醚甲环唑 Difenoconazole	0.66±0.81	y=0.056x+0.525	0.009	0.0001
戊唑醇 Tebuconazole	0.02±0.01	y=0.003x+0.011	0.163	0.0001
丙环唑 Propiconazole	0.69±0.55	y=0.146x+0.357	0.141	0.0001
氟环唑 Epoxiconazole	0.09±0.05	y=0.012x+0.057	0.139	0.0001
烯唑醇 Diniconazole	0.10±0.07	y=0.026x+0.044	0.200	0.0001
咯菌腈 Fludioxonil	0.02±0.01	y=0.002x+0.018	0.135	0.0001
噻呋酰胺 Thifluzamide	0.07±0.06	y=0.002x+0.064	0.003	0.0001
氟酰胺 Flutolanil	0.28±0.09	y=0.015x+0.241	0.059	0.0001
井冈霉素 Jinggangmycin	0.43±0.20	y=0.011x+0.408	0.008	0.0007
甲基立枯磷 Tolclofos-methyl	0.13±0.09	y=0.021x+0.086	0.116	0.0001

x 和 y 分别为三唑酮和其它杀菌剂对同一菌株的EC₅₀值。 x and y are the EC₅₀ values of the same isolate to triadimefon and other fungicides, respectively.

本试验测试的杀菌剂中尽管有6种同属于三唑类杀菌剂,但对小麦纹枯病菌的毒力差异很大。按照对小麦纹枯病菌EC₅₀的大小,6种三唑类杀菌剂可分为3类:第1类,EC₅₀≤0.1 μg/mL,包括戊唑醇、氟环唑及烯唑醇;第2类,EC₅₀≤1 μg/mL,包括苯醚甲环唑和丙环唑;第3类,EC₅₀>1 μg/mL,仅有三唑酮。不同杀菌剂对病菌的毒力差异较大,除了同杀菌剂本身的分子结构有关外,还可能与不同杀菌剂在病菌体内的靶标有关。三唑类杀菌剂的共同靶标是病菌体内的甾醇14α-脱甲基酶,即CYP51,但EC₅₀小、毒性高的杀菌剂在病菌体内可能还存在着别的作用靶标,从而表现为对病菌的抑制作用更明显(叶滔等,2012)。由于小麦纹枯病菌的基因组序列尚未公布,无法通过基因敲除及回复、定点突变、基因原核表达及同杀菌剂的体外结合等手段来研究小麦纹枯病菌的基因功能。应用转录组学可直接对小麦纹枯病菌在三唑类杀菌剂处理后的基因表达谱进行分析,并通过统计学的方法寻找差异表达基因,且可通过qRT-PCR等方法对基因功能进行验证。转录组测序技术必将应用在三唑类杀菌剂对小麦纹枯病菌

的分子药理学研究中。

三唑酮喷雾已应用于防治小麦纹枯病、白粉病、锈病等,其它三唑类杀菌剂,包括苯醚甲环唑和戊唑醇,对纹枯病菌也有很高的毒力,并也已应用在生产中(Hamda et al., 2011b; Zhou & Jia, 2015)。近十几年,其它一些类型的杀菌剂,包括咯菌腈、噻呋酰胺、氟酰胺等也陆续应用于小麦纹枯病防治,且表现出很好的防效(Hamda et al., 2011b; Zhang et al., 2015)。本研究结果表明,尽管三唑酮对小麦纹枯病菌的毒力同这些杀菌剂间有很微弱的正相关性,但产生交互抗性的可能性较小,生产中可轮换或交替使用这些杀菌剂来实施小麦纹枯病的化学防治。

参 考 文 献 (References)

- Chen HD, Ni GH, Wang ZM, Yuan SZ. 2005. Effects of seven herbicides on growth and pathogenicity of *Rhizoctonia cerealis* Vander Hoeven. Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Science Edition), 26(3): 66–69, 78 (in Chinese) [陈厚德, 倪桂花, 王彰明, 袁树忠. 2005. 7种除草剂对小麦纹枯病菌生长及致病力的影响. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 26(3): 66–69, 78]
- FAO. 1982. Recommended methods for the detection and measurement

- of resistance of agricultural pests to pesticides. *FAO Plant Protection Bulletin*, 30(2): 36–71
- Hamda MS, Yin YN, Chen HG, Ma ZH. 2011a. The escalating threat of *Rhizoctonia cerealis*, the causal agent of sharp eyespot in wheat. *Pest Management Science*, 67(11): 1411–1419
- Hamda MS, Yin YN, Ma ZH. 2011b. Sensitivity to iprodione, difenoconazole, and fludioxonil of *Rhizoctonia cerealis* isolates collected from wheat in China. *Crop Protection*, 30(8): 1028–1033
- Hu Y, Wang HX, Xia XM, Wang KY, Wang HY. 2006. Susceptibility of *Rhizoctonia cerealis* to six fungicides in four wheat areas. *Journal of Plant Protection*, 33(4): 423–427 (in Chinese) [胡燕, 王怀训, 夏晓明, 王开运, 王红艳. 2006. 四地区小麦纹枯病菌对6种杀菌剂的抗性比较. *植物保护学报*, 33(4): 423–427]
- Li HY, Qi YZ, Zhen WC. 2015. Composition and pathogenic analyses of the pathogen of wheat sharp eyespot in Hebei Province. *Journal of Plant Protection*, 42(4): 497–503 (in Chinese) [李海燕, 齐永志, 甄文超. 2015. 河北省小麦纹枯病菌群体组成及致病力分化. *植物保护学报*, 42(4): 497–503]
- Li MD, Li HX, Zhao GQ, Li ZY. 2014. Effects of triadimefon seed-coating formulation on growth of wheat seedling and main diseases control as well as yield increase. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 30(1): 316–320 (in Chinese) [李铭东, 李惠霞, 赵桂琴, 李昭煜. 2014. 三唑酮种衣剂对小麦生长的影响及防病增产效应. *中国农学通报*, 30(1): 316–320]
- Liu YH, Wang KY, Jiang XY, Yi MQ, Wang HX. 2003. Resistance of *Rhizoctonia cerealis* to tebuconazole and the biological characters of tebuconazole-resistant strains. *Journal of Plant Protection*, 30(4): 423–428 (in Chinese) [刘英华, 王开运, 姜兴印, 仪美芹, 王怀训. 2003. 禾谷丝核菌对戊唑醇的抗性及其抗药性菌系生物学特性. *植物保护学报*, 30(4): 423–428]
- Qi YZ, Li HY, Su Y, Zhen WC. 2014. Sensitivity to trifluzamide and main biological characteristics of resistant mutants of *Rhizoctonia cerealis*. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 16(3): 271–280 (in Chinese) [齐永志, 李海燕, 苏媛, 甄文超. 2014. 小麦纹枯病菌对噻呋酰胺的敏感性及其抗药性突变体的主要生物学性状. *农药学报*, 16(3): 271–280]
- Shen HF, Zhou EX, Qi PK. 2002. Effects of 6 herbicides on *Rhizoctonia solani* AG-1-1A. *Journal of Plant Protection*, 29(3): 249–253 (in Chinese) [沈会芳, 周而勋, 戚佩坤. 2002. 几种除草剂对水稻纹枯病菌的影响. *植物保护学报*, 29(3): 249–253]
- Shi JR, Wang YZ, Chen HG, Shen SW. 2000. Screening techniques and evaluation of wheat resistance to sharp eyespot caused by *Rhizoctonia cerealis*. *Journal of Plant Protection*, 27(2): 107–112 (in Chinese) [史建荣, 王裕中, 陈怀谷, 沈素文. 2000. 小麦纹枯病品种抗性鉴定技术及抗病资源的筛选与分析. *植物保护学报*, 27(2): 107–112]
- Sun HY, Ding XF, Du WZ, Li W, Chen HG. 2011. Monitoring of sensitivity of *Rhizoctonia cerealis* to jinggangmycin in Jiangsu, Henan, Anhui and Shandong provinces. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 13(6): 653–656 (in Chinese) [孙海燕, 丁晓菲, 杜文珍, 李伟, 陈怀谷. 2011. 江苏、河南、安徽和山东四省小麦纹枯病菌对井冈霉素的敏感性监测. *农药学报*, 13(6): 653–656]
- Sun K. 2013. Market and outlook of the top ten fungicides in the world. *Agrochemicals*, 52(7): 469–475 (in Chinese) [孙克. 全球十大杀菌剂的市场与展望. *农药*, 52(7): 469–475]
- van den Bosch F, Oliver R, van den Berg F, Paveley N. 2014. Governing principles can guide fungicide-resistance management tactics. *Annual Review of Phytopathology*, 52: 175–195
- Xu JQ, Diao XW, Li H, Yang X, Wang BB, Liu QT. 2016b. Sensitivity to difenoconazole and tebuconazole of *Rhizoctonia cerealis* in Henan Province in China. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 18(5): 582–588 (in Chinese) [徐建强, 刁兴旺, 李恒, 杨霞, 王蓓蓓, 刘庆涛. 2016b. 中国河南省小麦纹枯病菌对苯醚甲环唑及戊唑醇的敏感性. *农药学报*, 18(5): 582–588]
- Xu JQ, Ping ZL, Dang W, Li H, He DM, Zhu YG. 2017a. Sensitivity of *Rhizoctonia cerealis* to jinggangmycin and tolcllofos-methyl in Henan Province in China. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 19(1): 25–31 (in Chinese) [徐建强, 平忠良, 党威, 李恒, 何冬梅, 朱艳阁. 2017a. 中国河南省小麦纹枯病菌对井冈霉素及甲基立枯磷的敏感性. *农药学报*, 19(1): 25–31]
- Xu JQ, Ping ZL, Li HK, Yang X, Zhu YG, Li JT. 2017b. Sensitivity of *Rhizoctonia cerealis* to epoxiconazole and diniconazole in Henan Province. *Journal of Henan Agricultural University*, 51(1): 36–41, 70 (in Chinese) [徐建强, 平忠良, 李慧凯, 杨霞, 朱艳阁, 刘庆涛. 2017b. 河南省小麦纹枯病菌对氟环唑及烯唑醇的敏感性. *河南农业大学学报*, 51(1): 36–41, 70]
- Xu JQ, Wu SL, Zhao JJ, Hu XH, Wu YY, Yang GF, Fan QQ. 2017c. Sensitivity of *Rhizoctonia cerealis* to triadimefon in Henan Province. *Acta Phytopathologica Sinica*, 47(1): 138–141 (in Chinese) [徐建强, 伍士郎, 赵建江, 胡雪涵, 吴亚云, 杨改凤, 范倩倩. 2017c. 河南省小麦纹枯病菌对三唑酮的敏感性. *植物病理学报*, 47(1): 138–141]
- Xu JQ, Yang GF, Tian J, Che ZP, Kang YB. 2016a. Effects of carben-dazim, tebuconazole and azoxystrobin on sporulation and conidial germination of *Cladosporium paeoniae* causing tree peony red spot. *Journal of Plant Protection*, 43(5): 850–857 (in Chinese) [徐建强, 杨改凤, 田娟, 车志平, 康业斌. 2016a. 三种杀菌剂对牡丹红斑病菌分生孢子形成和萌发的影响. *植物保护学报*, 43(5): 850–857]
- Ye T, Ma ZQ, Bi QY, Niu FS, Han XY, Zhang XF, Wang WQ, Zhang LH. 2012. Research advances on the resistance of plant pathogenic fungi to SBIs fungicides. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 14(1): 1–16 (in Chinese) [叶滔, 马志强, 毕秋艳, 牛芳胜, 韩秀英, 张小风, 王文桥, 张利辉. 2012. 植物病原真菌对甾醇生物合成抑制剂类(SBIs)杀菌剂的抗药性研究进展. *农药学报*, 14(1): 1–16]
- Zhang Y, Lu JL, Wang JX, Zhou MG, Chen CJ. 2015. Baseline sensitivity and resistance risk assessment of *Rhizoctonia cerealis* to trifluzamide, a succinate dehydrogenase inhibitor. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 124: 97–102
- Zhou MG, Jia XJ. 2015. Wheat pathogens in China.//Ishii H, Hollomon DW. *Fungicide resistance in plant pathogens: principles and a guide to practical management*. Tokyo: Springer Press, pp. 313–328

(责任编辑:李美娟)