

引起山西省小麦纹枯病的丝核菌融合群鉴定及其对不同杀菌剂的敏感性



史晓晶^{1*} 王华杰² 雷 慧¹ 赵丽娟¹

(1. 忻州师范学院生物系, 山西 忻州 034000; 2. 忻州市市场监督管理局, 山西 忻州 034000)

摘要: 为明确引起山西省小麦纹枯病的丝核菌 *Rhizoctonia* 种类及其对杀菌剂的敏感性, 通过形态学特征观察、rDNA ITS 序列分析及致病性测定鉴定分离自 23 个麦区小麦病样的 195 株纹枯病菌, 并采用菌丝生长速率法测定菌株对氟酰胺、噻呋酰胺和己唑醇的敏感性。结果显示, 所有菌株的菌落形态接近于丝核菌, 呈双核, 可与融合群(anastomosis group, AG) D 组各亚群菌株菌丝发生融合反应, 但在系统发育树中全部与 AG-DI 亚群菌株聚为一支, 表明 195 株菌株均为禾谷丝核菌 *R. cerealis* AG-DI 亚群, 且经致病性试验验证这些菌株均为山西省小麦纹枯病的病原菌。氟酰胺、噻呋酰胺和己唑醇对菌株的 EC_{50} 范围分别为 0.092~0.610、0.067~0.142 和 0.008~0.111 $\mu\text{g/mL}$, 均值分别为 0.331、0.074 和 0.052 $\mu\text{g/mL}$, 且菌株对氟酰胺、噻呋酰胺和己唑醇的敏感性频率分布均呈连续的单峰曲线, 因此可将以上均值作为山西省小麦纹枯病病原菌禾谷丝核菌 AG-DI 亚群对氟酰胺、噻呋酰胺和己唑醇的敏感基线。

关键词: 小麦纹枯病; 禾谷丝核菌 AG-DI; 氟酰胺; 噻呋酰胺; 己唑醇

Identification of anastomosis groups and evaluation of fungicide sensitivity of soilborne fungus *Rhizoctonia* isolates causing wheat sharp eyespot in Shanxi Province

Shi Xiaojing^{1*} Wang Huajie² Lei Hui¹ Zhao Lijuan¹

(1. Department of Biology, Xinzhou Normal University, Xinzhou 034000, Shanxi Province, China;

2. Xinzhou Administration for Market Regulation, Xinzhou 034000, Shanxi Province, China)

Abstract: To clarify the etiology of wheat sharp eyespot and the fungicide sensitivity of the pathogen, 195 *Rhizoctonia* isolates, obtained from wheat sheath with sharp eyespot symptoms collected from 23 wheat-grown areas in Shanxi Province, were identified based on morphological traits, phylogenetic analyses of rDNA ITS, and pathogenicity test. Meanwhile, EC_{50} values of all the isolates were determined by mycelial growth rate method for flutolanil, thifluzamide, and hexaconazole. The results showed that the colonies of all the isolates with two nuclei in each hyphal cell were similar with *Rhizoctonia* spp., and these isolates were placed in anastomosis group (AG) D in hyphal fusion tests. All the isolates were clustered in the same clade with AG-DI isolates in phylogenetic tree. Therefore, all the 195 isolates were identified as *Rhizoctonia cerealis* AG-DI which was regarded as the causal agent of wheat sharp eyespot in Shanxi Province. The EC_{50} ranges of flutolanil, thifluzamide, and hexaconazole were 0.092–0.610, 0.067–0.142, and 0.008–0.111 $\mu\text{g/mL}$, respectively, among these isolates, with a mean EC_{50} of 0.331, 0.074, and 0.052 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The sensitivity frequencies were all continuous unimodal curves for all the three fungicides. These mean EC_{50} could be used as the sensitivity base-

基金项目: 山西省基础研究计划(20210302124623), 山西省高等学校科技创新项目(2021L464), 山西省忻州市科技计划应用基础项目(20210104)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: xzsxj@sina.com

收稿日期: 2021-02-28

lines of flutolanil, thifluzamide, and hexaconazole for *R. cerealis* AG-DI causing wheat sharp eyespot in Shanxi Province.

Key words: wheat sharp eyespot; *Rhizoctonia cerealis* AG-DI; flutolanil; thifluzamide; hexaconazole

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,几乎遍布各温带麦区(韩月澎等,2001;王怀训等,2001)。因小麦品种的更换、农业栽培制度的改变(如密植、早播等)及肥水条件的改善等,使得该病害在我国冬小麦种植区的发生逐年加重(于金凤等,2007;Hamada et al.,2011;徐建强等,2017)。纹枯病可在小麦的整个生育期发生,主要危害茎秆基部,形成中部为灰白色、边缘为浅褐色、整体呈云纹状的病斑。发病严重时会引起小麦倒伏、枯死并造成灰白穗,从而影响小麦的有效穗数及千粒重,对产量的影响极大,一般年份使小麦减产10%~20%,严重时减产达50%左右(Lemańczyk & Kwaśna,2013)。

小麦纹枯病病原菌以禾谷丝核菌 *Rhizoctonia cerealis* 为主,所属融合群(anastomosis groups, AG)为D组(AG-D)(陈延熙等,1986;段学兰等,2018;徐建强等,2018a)。AG-D包含AG-DI、AG-DII和AG-DIII三个融合亚群(Toda et al.,1999),而AG-DI被认为是导致中国小麦纹枯病的主要融合亚群(Li et al.,2014)。另外,立枯丝核菌 *R. solani* 中的AG-1-IB(陈莹,2009;杜文珍,2012)、AG-1-IC(喻大昭等,2000;杜文珍,2012)、AG-2-2(高增玉等,2005)、AG-2-IIIB(喻大昭等,2000)、AG-2-BI(喻大昭等,2000)、AG-4(李海燕等,2015;于晓丽等,2017)、AG-5(李海燕等,2015;于晓丽等,2017)、AG-11(陈莹,2009)和双核丝核菌 *Rhizoctonia* spp. 中的AG-Bo(朱明德和刘新安,1988;李海燕等,2015)、AG-E(高增玉等,2005)、AG-F(高增玉等,2005)、AG-I(李海燕等,2015)、AG-R(高增玉等,2005)等融合群和亚群也可侵染小麦引起纹枯病。

使用杀菌剂防治病害是目前最普遍且最有效的方法(徐建强等,2018a;史晓晶等,2019)。吡唑醚菌酯和戊唑醇对禾谷丝核菌有强烈的抑制作用,EC₅₀分别为0.367 μg/mL和0.187 μg/mL,拌种使用对小麦纹枯病的预防效果较好,对枯白穗的预防效果均在85%以上(芦勇,2017)。徐建强等(2018a)监测到2016年河南省小麦纹枯病菌对三唑酮的敏感性相较于2015年有所降低,建议应在生产中持续监测小麦纹枯病菌对药剂敏感性的动态变化。噻呋酰胺和己唑醇是登记用于防治小麦纹枯病的杀菌剂。氟

酰胺主要用于防治丝核菌引起的禾本科作物纹枯病(宋立妹和张军民,2013),噻呋酰胺则主要用于防治玉米纹枯病和马铃薯黑痣病(孟润杰等,2018)。氟酰胺与噻呋酰胺均为琥珀酸脱氢酶抑制剂(succinate dehydrogenase inhibitor, SDHI)类杀菌剂,氟酰胺属于苯基-苯甲酰胺类,噻呋酰胺为噻唑-酰胺类。SDHI类杀菌剂中杂环种类和杂环上取代基及取代位置的不同都会使其杀菌谱和杀菌效果存在一定差异(申瑞平等,2014)。己唑醇为麦角甾醇生物合成抑制剂中的三唑类杀菌剂。目前,并没有关于小麦纹枯病病原菌对以上3种杀菌剂敏感性的报道。小麦在山西省的种植面积仅次于玉米,在当前纹枯病发生逐年加重的情况下,要实现小麦的稳产甚至增产,病害的防治显得尤为重要。因此,本研究将对引起山西省小麦纹枯病的病原菌进行鉴定,测定病原菌对氟酰胺、噻呋酰胺和己唑醇的敏感性并建立敏感基线,以期山西省田间小麦纹枯病的防治提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试病样:于2017—2018年从山西省运城市的河津市、永济市、平陆县、闻喜县、临猗县、夏县、绛县、稷山县、垣曲县、新绛县和芮城县,临汾市的尧都区、侯马市、霍州市、曲沃县、翼城县、襄汾县和洪洞县,晋城市的泽州市和阳城县,长治市的上党区,晋中市的介休市和平遥县,共23个麦区300个采样点采集患有纹枯病的小麦病样共300份。

供试菌株:菌丝融合参考菌株共9株,其中菌株Cs-Ka(AG-1-IA)、FuK-600(AG-A)、C484(AG-Ba)、Ayu-WP-1(AG-DI)、TAK-14KT(AG-DII)、KOU04-12FW(AG-DIII)、RH-155(AG-E)和55D45(AG-K)由日本北海道大学Norio Kondo教授提供,在中国农业大学植物保护学院经济作物真菌病害实验室于-80℃保存备用;菌株HL-ZA(AG-W)由中国农业大学植物保护学院经济作物真菌病害实验室保存并提供。

供试小麦:小麦品种为晋太182,种子由山西农业大学作物科学研究所提供。按体积比1:1:1将营养土、蛭石和沙混合,160℃干热灭菌6 h,冷却后分

装到育苗钵,备用。用0.1% NaClO浸泡小麦种子20 min,无菌水冲洗2次,晾干,于25℃温室中播种培养,自然光照,待小麦长出2片真叶时供试。另外,取少许小麦种子121℃高压灭菌25 min,作为致病性测定中制备接种体的原材料。

供试药剂:98.9% 氟酰胺(flutolanil)原药,浙江盛通生物科技有限公司;97.2% 噻呋酰胺(thifluzamide)原药,山东康乔生物科技有限公司;95.0% 己唑醇(hexaconazole)原药,江苏七洲绿色化工股份有限公司。农药原药溶于甲醇均配制成10 mg/mL母液,4℃保存备用。

供试培养基:马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基成分为马铃薯200 g、葡萄糖20 g、琼脂粉20 g、蒸馏水1 L;水琼脂(water agar, WA)培养基成分为琼脂粉20 g、蒸馏水1 L;上述培养基均于121℃高压灭菌25 min后备用。

试剂和仪器:Taq Mater Mix,北京天一辉远生物科技有限公司;Ezup柱式真菌基因组DNA抽提试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司;其余试剂为国产分析纯或进口纯。BX53显微镜,奥林巴斯(中国)有限公司;DM2500荧光显微镜,徕卡(中国)有限公司;T100型梯度PCR仪,伯乐(中国)有限公司;DYCP-31NA型电泳仪,北京市六一仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 病样症状观察和病原菌的分离纯化

将采集的300份病样用自来水冲洗干净,去掉杂质,晾干。在病健交界处切下约5 mm×5 mm小块,70%酒精浸泡30 s,5% NaClO溶液浸泡3 min,无菌水清洗3次,晾干,接种于含有50 μg/mL硫酸链霉素的WA平板上,25℃黑暗培养12~36 h。挑取菌丝尖端转接于WA平板上,25℃黑暗培养12 h;再次挑取菌丝尖端转接于PDA平板上,25℃纯化培养,即获得纯化菌株。

1.2.2 分离菌株的形态学特征观察

菌落形态学特征观察:将1.2.1分离菌株在PDA平板上于25℃黑暗培养2 d后,在其菌落边缘用打孔器打取直径为5 mm的菌饼,分别接种于新的PDA平板中央,25℃黑暗培养,每隔24 h观察并记录菌丝颜色变化、菌核有无及其大小和颜色等。观察至少持续2周,每株菌株重复3次。

细胞核染色:分别取上述待测菌株的直径为5 mm的菌饼各1个,菌丝面朝上置于无菌载玻片中央,载玻片放入培养皿中,25℃黑暗培养;待玻片上菌落直径长至3 cm时,除去菌饼,滴2滴1 μg/mL的

4',6-二脒基-2-苯基吲哚进行荧光染色,10 min后盖上盖玻片,在400倍荧光显微镜的紫外光下观察每个菌丝细胞中的荧光点(即细胞核)并记录,每株菌株至少镜检属于不同菌丝的20个细胞。

菌丝融合观察:将9株菌丝融合参考菌株分别接种在PDA平板上,25℃黑暗培养2 d,在菌落边缘用打孔器制备直径为5 mm的菌饼,取待测菌株和菌丝融合参考菌株的直径5 mm菌饼各1个,菌丝面朝上接种于同一载玻片上,两者间隔2 cm,将载玻片放入培养皿中,25℃黑暗保湿培养24~48 h。当两者菌丝重叠约5 mm时除去菌饼,置于400倍普通光学显微镜下,根据菌丝融合判断标准来观察重叠区的融合情况。菌丝融合判断标准(Sneh et al., 1996)为:菌丝无融合反应为C0,表示为不具有亲缘关系,是不同的融合群;菌丝接触,或细胞壁连接明显但分界明显或细胞膜不接触,或接触的细胞及相邻细胞偶尔死亡为C1,表示为较远的亲缘关系,是不同的融合群或相同的融合群;细胞壁连接明显,而不确定细胞膜是否接触,或融合位置明显,融合点直径小于菌丝直径,或发生融合及附近细胞通常死亡为C2,表示具有亲缘关系,是相同的融合群,不同的营养体亲和群;细胞壁和细胞膜均发生融合,或融合点通常不明显,或融合点直径等于或几乎等于菌丝直径,或发生融合及附近的细胞极少死亡为C3,表示为较近的亲缘关系,是相同的融合群,相同的营养体亲和群。

1.2.3 分离菌株的rDNA ITS序列分析

将所有分离菌株分别接种于铺有无菌玻璃纸的PDA平板上,25℃黑暗培养3 d,刮取玻璃纸上的菌丝,并将其置于无菌研钵中,加入液氮研磨成粉用于基因组DNA的提取。根据Ezup柱式真菌DNA抽提试剂盒说明书提取所有分离菌株的基因组DNA。采用通用引物ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')扩增待测菌株的rDNA ITS序列(White et al., 1990),引物均由北京天一辉远生物技术有限公司合成。25 μL反应体系:Taq Master Mix 12.5 μL、菌株基因组DNA 1.0 μL、ITS1/ITS4引物各0.5 μL、ddH₂O 10.5 μL。以不加菌株基因组DNA的反应体系为阴性对照。扩增条件:94℃预变性5 min;94℃变性10 s,58℃退火15 s,72℃延伸10 s,共30个循环;最后72℃延伸2 min。PCR产物送至北京天一辉远生物技术有限公司测序。测序结果提交至GenBank并进行BLAST比对,用MEGA 7.0.26软件中Clustal W

程序以最大似然法 Tamura-Nei 模型构建系统发育树, Bootstrap 设为 1 000 次重复, 系统发育树只显示大于 70% 的 Bootstrap 值。

1.2.4 分离菌株的致病性测定

根据柯赫法则验证 1.2.1 分离菌株是否为引起小麦纹枯病的病原菌而进行致病性试验。随机选择 30 株菌株, 将 1.2.2 制备的各菌株的直径 5 mm 菌饼分别接种于 PDA 平板中央, 25℃ 黑暗培养 3 d, 然后将无菌小麦种子置于菌落上方, 再于相同条件下连续培养 5~7 d, 待小麦种子附满菌丝后作为接种体供试。取 2 叶期小麦幼苗, 在其根基部放 1 粒接种体, 灭菌土覆盖 1 cm 厚, 以无菌麦粒为对照。每处理接种 10 株小麦植株, 接种后 3~5 d 连续观察小麦生长情况, 21 d 后挖出小麦植株观察发病情况, 并从发病小麦的病斑上再次分离病原菌, 采用 1.2.2 和 1.2.3 方法进行鉴定, 验证接种菌株和再分离菌株性状是否相同, 以完成柯赫法则验证。

1.2.5 分离菌株对不同杀菌剂的敏感性测定

采用菌丝生长速率法测定分离菌株对不同杀菌剂的敏感性。用甲醇将氟酰胺、噻呋酰胺和己唑醇母液分别稀释成 5 个浓度, 其中氟酰胺浓度分别为 0.05、0.10、0.20、0.40 和 0.80 mg/mL; 噻呋酰胺浓度分别为 0.01、0.02、0.04、0.08 和 0.16 mg/mL; 己唑醇浓度分别为 0.02、0.04、0.06、0.08 和 0.10 mg/mL。将各浓度药剂按照体积比 1:1 000 加入到约 55℃ 的 PDA 培养基中, 摇匀后制成含最终检测浓度的含药 PDA 平板。以含有 0.1% 甲醇的 PDA 平板为对照。取 1.2.2 制备的待测菌株直径为 5 mm 的菌饼, 菌丝面朝下分别接于含药 PDA 平板中央, 25℃ 黑暗培养 3 d 后采用十字交叉法测量菌落直径, 并计算不同浓度杀菌剂对菌株的生长抑制率。每个处理重复 3 次。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) × 100%。以生长抑制率为 y 值, 杀菌剂浓度的 $\log$ 值为 x 值, 得出毒力回归方程 $y = a + bx$, 并计算各杀菌剂对小麦纹枯病病原菌的 EC_{50} 值。

通过 SPSS 17.0 软件先构建待测菌株 EC_{50} 值的箱图 (boxplot) 以检验数据分布的分散程度及异常值; 接着剔除异常值, 绘制带有正态曲线的直方图, 该图即为敏感性频率分布柱状图; 然后采用 Shapiro-Wilk 法检验 EC_{50} 值是否服从正态分布; 最后将服从正态分布的 EC_{50} 均值作为菌株对氟酰胺、噻呋酰胺和己唑醇的敏感基线 (徐建强, 2018b), 并分析菌株对这 3 种杀菌剂的敏感性差异。

1.3 数据分析

试验数据均采用 DPS 7.05、SPSS 17.0 和 Excel 2010 软件处理, 应用 Duncan 氏新复极差法检验菌株对不同杀菌剂敏感性的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 小麦纹枯病发病症状观察与病原菌分离

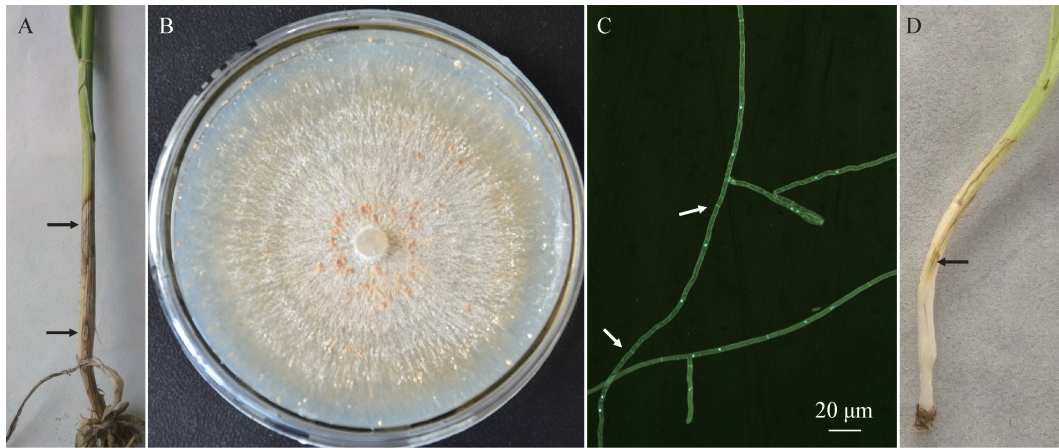
小麦纹枯病多发于小麦茎基部第 1 叶鞘上, 病斑中部呈灰褐色, 边缘为深褐色 (图 1-A), 病斑逐渐扩展时会合并成不规则的云纹状大病斑。分离结果显示, 从同一采集点的样本中分离到多株疑似丝核菌的菌株, 对具有相同菌落形态的菌株只保留 1 株, 最终从晋城市分离到 12 株, 从晋中市分离到 32 株, 从临汾市分离到 70 株, 从运城市分离到 80 株, 从长治市分离到 1 株, 共获得 195 株丝核菌疑似分离物, 分离率为 65.00%。

2.2 分离菌株的形态学特征

所有 195 株菌株菌丝在 PDA 培养基上生长初期为白色, 后期变为淡黄色, 气生菌丝稀疏, 有轮纹; 初期菌落上出现白色菌丝球, 后菌丝球变为直径为 0.1~0.3 cm 的淡橘色菌核 (图 1-B)。荧光染色观察发现所有菌株的细胞核均为双核, 菌丝直径介于 4.21~6.12 μm 之间 (图 1-C)。所有菌株的菌丝均可与参考菌株 Ayu-WP-1 (AG-DI)、TAK-14KT (AG-DII) 和 KOU04-12FW (AG-DIII) 的菌丝发生融合反应, 而与参考菌株 Cs-Ka (AG-I-IA)、FuK-600 (AG-A)、C484 (AG-Ba)、RH-155 (AG-E)、55D45 (AG-K) 和 HL-ZA (AG-W) 的菌丝不能融合, 表明本研究分离得到的菌株从形态学上与双核丝核菌中的禾谷丝核菌 AG-D 一致。

2.3 分离菌株的 rDNA ITS 序列分析

195 株菌株的 rDNA ITS 序列大小均约为 685 bp, 与 GenBank 中禾谷丝核菌 D32 菌株 rDNA ITS 序列 (登录号为 JQ767986) 的相似度大于 99%。将所有菌株的 rDNA ITS 序列提交至 GenBank, 获得登录号为 MT512682~MT512876。从中选择培养性状存在差异的代表性菌株 10 株, 基于 rDNA ITS 序列构建系统发育树, 发现 10 株菌株与参考菌株 YC-SDS-1 (登录号为 AB198699)、SD-SDS-1 (登录号为 AB198701) 和 W-2 (登录号为 AB198697) 聚在了 AG-DI 分支, 且与 AG-DII 分支和 AG-DIII 分支明显分开 (图 2)。结合形态学特征, 最终确定 195 株菌株均为禾谷丝核菌 *R. cerealis* AG-DI 亚群。



A和D图中黑色箭头所指为病斑；C图中白色箭头所指为菌隔，荧光点为细胞核。The black arrows in Fig. A and D pointed to sharp eyespot lesions; the white arrows in Fig. C pointed to hyphal septa, and the light spots were nuclei.

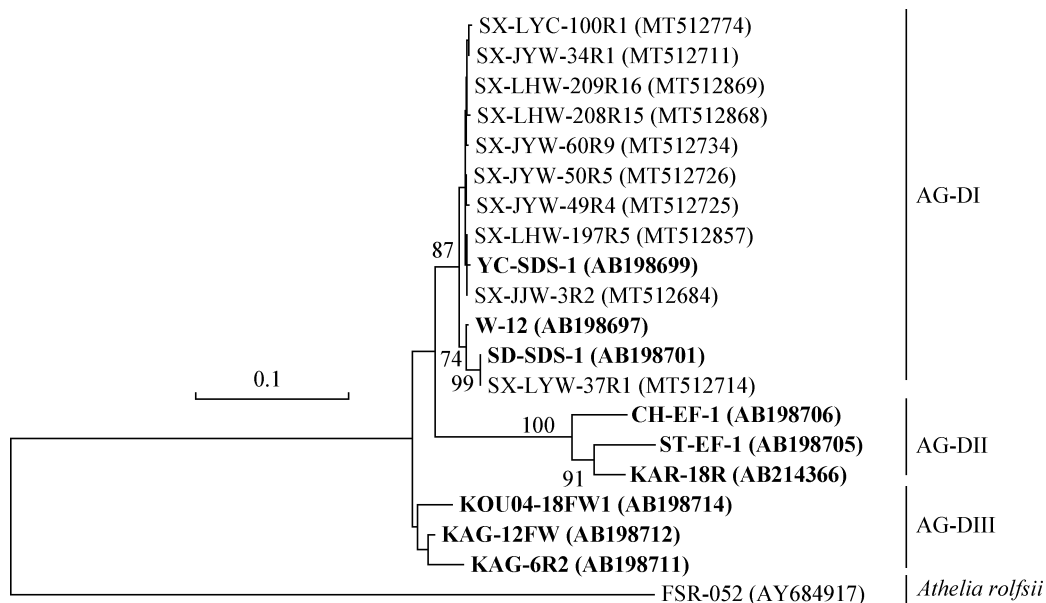
图1 小麦纹枯病的田间症状(A)和分离菌株的菌落形态(B)、细胞核荧光染色(C)及其致病性(D)

Fig. 1 Symptoms of wheat sharp eyespot in fields (A), colony morphology (B), nuclei with fluorescent staining (C), and pathogenicity (D) of an isolate from wheat

2.4 分离菌株的致病性验证

致病性试验发现 30 株菌株均可在小麦植株基部叶鞘上形成中间为灰色、边缘为浅褐色的小麦纹枯病典型病斑(图 1-D),对从病斑上再次分离的病

原菌进行形态学鉴定,结果显示接种菌株和再分离菌株相同,表明本研究分离到的菌株均为小麦纹枯病的病原菌。



参考菌株以菌株编号(GenBank 登录号)且字体加粗的形式表示,其他为本研究分离菌株。齐整小核菌 FSR-052 菌株为外群。The reference sequences downloaded from GenBank are shown in bold fonts followed by their accession number in parentheses; the other isolates obtained in this study. *Athelia rolfsii* isolate FSR-052 was used as outgroup.

图2 基于 rDNA ITS 序列以最大似然法构建山西省小麦纹枯病病原菌部分菌株及参考菌株的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on rDNA ITS sequences of some isolates identified as pathogen causing wheat sharp eyespot in Shanxi Province and reference strains using maximum likelihood method

2.5 分离菌株对杀菌剂的敏感性及其敏感基线的建立
氟酰胺对 195 株菌株的 EC_{50} 范围介于 0.092~1.229 $\mu\text{g/mL}$ 之间, EC_{50} 的最大值和最小值相差

13.34 倍;噻呋酰胺对 195 株菌株的 EC_{50} 范围介于 0.067~0.198 $\mu\text{g/mL}$ 之间, EC_{50} 的最大值和最小值相差 2.94 倍;己唑醇对 195 株菌株的 EC_{50} 范围介于

0.008~0.537 $\mu\text{g/mL}$ 之间, EC_{50} 的最大值和最小值相差 67.06 倍, 所有菌株的相关系数都介于 0.9~1.0 之间, 表明计算的 EC_{50} 值真实可信。构建所有菌株的箱图发现氟酰胺的 EC_{50} 值分散程度较大且存在 10 个异常值, 噻呋酰胺和己唑醇的 EC_{50} 值分散程度较小, 但也分别存在 6 个和 22 个异常值; 氟酰胺的中位数最大, 为 0.339 $\mu\text{g/mL}$, 而己唑醇的中位数最小, 为 0.054 $\mu\text{g/mL}$ (图 3-A)。

剔除异常值后, 氟酰胺对 185 株菌株的 EC_{50} 范围介于 0.092~0.610 $\mu\text{g/mL}$ 之间, EC_{50} 的最大值和最小值相差 6.63 倍, 均值为 0.331 $\mu\text{g/mL}$; 噻呋酰胺对 189 株菌株的 EC_{50} 范围介于 0.067~0.142 $\mu\text{g/mL}$ 之间, EC_{50} 的最大值和最小值相差 2.11 倍, 均值为

0.074 $\mu\text{g/mL}$; 己唑醇对 173 株菌株的 EC_{50} 范围介于 0.008~0.111 $\mu\text{g/mL}$ 之间, EC_{50} 的最大值和最小值相差 13.70 倍, 均值为 0.052 $\mu\text{g/mL}$ (表 1)。这些菌株对氟酰胺、噻呋酰胺和己唑醇的敏感性频率分布均呈连续的单峰曲线, 其 EC_{50} 值经 Shapiro-Wilk 检验后, P 值分别为 0.162、0.452 和 0.096, 均大于 0.05, 服从正态分布 (图 3-B~D)。因此可将 EC_{50} 均值 0.331、0.074 和 0.052 $\mu\text{g/mL}$ 分别作为山西省小麦纹枯病病原菌对氟酰胺、噻呋酰胺和己唑醇的敏感基线。3 种杀菌剂中, 小麦纹枯病病原菌菌株对己唑醇最敏感, 对噻呋酰胺的敏感性次之, 对氟酰胺最不敏感, 三者的 EC_{50} 均值差异显著 (表 1)。

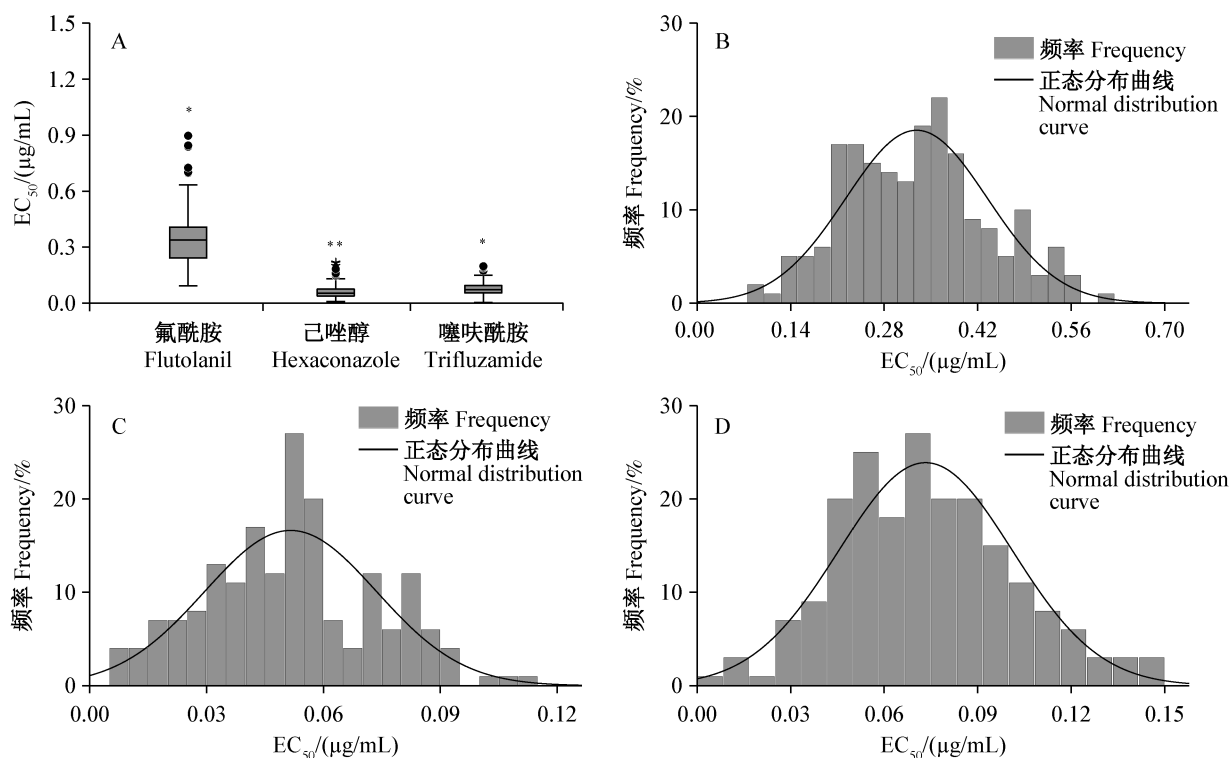


图 3 氟酰胺、己唑醇和噻呋酰胺对山西省小麦纹枯病病原菌株的 EC_{50} 值分布箱图 (A) 及菌株对氟酰胺 (B)、己唑醇 (C) 和噻呋酰胺 (D) 敏感性的正态分布图

Fig. 3 Boxplot of EC_{50} values (A), and frequency distribution curve of sensitivity of isolates causing wheat sharp eyespot in Shanxi Province to flutolanil (B), hexaconazole (C), and trifluzamide (D)

表 1 山西省小麦纹枯病病原菌株对氟酰胺、噻呋酰胺和己唑醇的敏感性

Table 1 Sensitivity of isolates causing wheat sharp eyespot in Shanxi Province to flutolanil, trifluzamide, and hexaconazole

杀菌剂 Fungicide	菌株数量 Number of isolates	EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	
		范围 Range	均值±标准差 Mean±SD
氟酰胺 Flutolanil	185	0.092~0.610	0.331±0.106 a
噻呋酰胺 Trifluzamide	189	0.067~0.142	0.074±0.027 b
己唑醇 Hexaconazole	173	0.008~0.111	0.052±0.022 c

同列数据后不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

3 讨论

我国一些省份的小麦纹枯病病原菌群体结构组成较为复杂。朱明德和刘新安(1988)从河南省小麦上分离到立枯丝核菌 AG-2-BI、双核丝核菌 AG-Bo 和禾谷丝核菌 AG-D;而徐建强等(2018a)在 30 年后只分离到禾谷丝核菌 AG-D。喻大昭等(2000)分析了引起湖北省小麦纹枯病病原菌的组成,确定存在立枯丝核菌 AG-1-IC、AG-4、AG-5、AG-2-IIIB 和禾谷丝核菌 AG-D 这 6 种融合群或亚群。高增玉等(2005)发现河北省小麦纹枯病病原菌的种类有立枯丝核菌 AG-4、AG-5、AG-2-2,双核丝核菌 AG-E、AG-F、AG-R 和禾谷丝核菌 AG-D;之后李海燕等(2015)发现除了优势融合群仍是禾谷丝核菌 AG-D 外,还分离到双核丝核菌 AG-Bo 和 AG-I。陈莹(2009)发现江苏省、安徽省、河南省和湖北省的小麦纹枯病病原菌有立枯丝核菌 AG-1-IB、AG-5、AG-11 和禾谷丝核菌 AG-D。杜文珍(2012)从江苏省、山东省、河南省、安徽省和河北省患有纹枯病的小麦上分离到立枯丝核菌 AG-1-IB、AG-1-IC、AG-5 和禾谷丝核菌 AG-D。于晓丽等(2017)认为山东省烟台市的小麦纹枯病病原菌有立枯丝核菌 AG-4、AG-5 和禾谷丝核菌 AG-D;而段学兰等(2018)在青岛市只分离出禾谷丝核菌 AG-D。虽然上述研究中提到的丝核菌融合群或亚群类型较多,但小麦纹枯病的病原菌始终以禾谷丝核菌 AG-D 为主。本研究首次详细报道了引起山西省小麦纹枯病病原菌——丝核菌的群体结构,发现组成结构单一,分离到的菌株均为禾谷丝核菌 AG-DI 亚群,尚未分离到其他融合群或亚群。在山西省,小麦主要与玉米进行轮作,玉米纹枯病的病原菌优势融合群为多核的立枯丝核菌 AG-1-IA(崔丽娜等,2015),且未见有 AG-1-IA 亚群侵染引起小麦病害的报道,因此有可能是这种作物轮作制度限制了上述文献中报道的其他融合群或亚群在小麦纹枯病丝核菌群体结构中的发展。同时,本研究结果与对河南省(徐建强等,2018a)和山东省青岛市(段学兰等,2018)小麦纹枯病菌的鉴定结果较一致,但这 2 个地方的菌株均未采用完整的系统分类法,如构建系统发育树进行聚类分析等,致使菌株未被鉴定到亚群。本研究结果可为山西省抗纹枯病小麦品种的选择、培育提供一定的技术指导,并且明确了今后防治山西省小麦纹枯病的主要对象,应将禾谷丝核菌 AG-DI 亚群作为施用杀菌剂的

主要靶标对象来制订防治策略。

建立敏感基线是杀菌剂抗性风险评估与治理的重要内容,可为后期抗药性监测奠定基础(杨连来等,2007;史晓晶等,2016)。Zhang et al.(2015)利用来自于河南省、山东省、安徽省和江苏省的 120 株小麦纹枯病菌建立了其对噻呋酰胺的敏感基线,为 $0.064\text{ }\mu\text{g/mL}$,显著低于山西省小麦纹枯病菌对噻呋酰胺的敏感基线 $0.074\text{ }\mu\text{g/mL}$;而江苏省小麦纹枯病菌对氟酰胺的敏感基线 $0.406\text{ }\mu\text{g/mL}$ (宋立妹和张军民,2013),显著高于山西省小麦纹枯病菌对氟酰胺的敏感基线 $0.331\text{ }\mu\text{g/mL}$ 。这种现象可能是由于菌株来源地不同而导致其对杀菌剂的敏感性存在差异。目前,己唑醇敏感性的研究对象多集中于水稻纹枯病菌。刘惠芳等(2020)测定了来自于贵州省、湖北省、湖南省和河南省 7 个稻区的 101 株水稻纹枯病菌对己唑醇的敏感性,并认为 $1.808\text{ }\mu\text{g/mL}$ 可作为其敏感基线,与本研究建立的小麦纹枯病菌对己唑醇的敏感基线 $0.052\text{ }\mu\text{g/mL}$ 相差较大。究其原因,可能是由于水稻纹枯病菌是立枯丝核菌 AG-1-IA 亚群(Mu et al.,2017),与小麦纹枯病菌禾谷丝核菌 AG-DI 亚群为同属的不同种,因此两者对同一杀菌剂的敏感性亦存在差异。

禾谷丝核菌 AG-DI 亚群菌株对氟酰胺、噻呋酰胺和己唑醇的敏感性也存在明显差异,虽然对氟酰胺的敏感性最差,但依据其 EC_{50} 范围 $0.092\sim 0.610\text{ }\mu\text{g/mL}$ 可知氟酰胺对小麦纹枯病菌具有较好的抑制效果。因此,在山西省小麦病害防治中可引入氟酰胺作为小麦纹枯病的防治药剂。本研究建立的小麦纹枯病菌对氟酰胺、噻呋酰胺和己唑醇的敏感基线可为这 3 种药剂的抗性风险评估提供一定参考,而这 3 种药剂间与其他药剂间的混合或交替使用策略还需进一步研究。

参 考 文 献 (References)

- Chen Y. 2009. Pathogen and virulence analysis of wheat sharp eyespot and wheat stem base rot. Master thesis. Nanjing: Nanjing Agricultural University (in Chinese) [陈莹. 2009. 小麦纹枯病和茎基腐病病原菌组成及致病力分析. 硕士学位论文. 南京: 南京农业大学]
- Chen YX, Tang WH, Zhang DH, Jian XY. 1986. A preliminary study on etiology of sharp eyespot of wheat in China. Journal of Plant Protection, 13(1): 39–44 (in Chinese) [陈延熙, 唐文华, 张敦华, 简小鹰. 1986. 我国小麦纹枯病病原学的初步研究. 植物保护学报, 13(1): 39–44]

- Cui LN, Zhang XF, Zou CJ, Li X, Yang XR, Xiang YJ. 2015. Population structure of *Rhizoctonia* spp. isolated from maize in southwestern China and UP-PCR analysis. *Journal of Plant Protection*, 42(6): 914–920 (in Chinese) [崔丽娜, 张小飞, 邹成佳, 李晓, 杨晓蓉, 向运佳. 2015. 西南地区玉米纹枯病菌融合群鉴定和UP-PCR分析. *植物保护学报*, 42(6): 914–920]
- Du WZ. 2012. Pathogenicity and genetic diversity of *Rhizoctonia cerealis* and dsDNA within it. Master thesis. Nanjing: Nanjing Agricultural University (in Chinese) [杜文珍. 2012. 小麦纹枯病菌的致病力、遗传多样性及其所含dsRNA的研究. 硕士学位论文. 南京: 南京农业大学]
- Duan XL, Wang JL, Liu T, Zhao Y, Huang JG. 2018. Pathogen identification and disease analysis of wheat sharp eyespot in Qingdao. *China Plant Protection*, 38(2): 17–20 (in Chinese) [段学兰, 王健力, 刘婷, 赵颖, 黄金光. 2018. 青岛市小麦纹枯病病原菌鉴定及其病害分析. *中国植保导刊*, 38(2): 17–20]
- Gao ZY, Ma JF, Dong L, Jiang JD, Chuo HE, Dong ZP. 2005. Identification of pathogenic anastomosis groups and pathogenicity of *Rhizoctonia* causal agent of sharp eyespot of wheat in Hebei Province. //Cheng ZM. Research on prevention and control of agricultural biological disasters: Academic Annual Conference of China Society of Plant Protection in 2005. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, pp. 163–166 (in Chinese) [高增玉, 马继芳, 董立, 姜京宇, 啜会娥, 董志平. 2005. 河北省小麦纹枯病病原菌分类及致病力测定. //成卓敏. 农业生物灾害预防与控制研究: 中国植物保护学会2005年学术年会论文集. 北京: 中国农业科学技术出版社, pp. 163–166]
- Hamada MS, Yin YN, Chen HG, Ma ZH. 2011. The escalating threat of *Rhizoctonia cerealis*, the causal agent of sharp eyespot in wheat. *Pest Management Science*, 67(11): 1411–1419
- Han YP, Chen XL, He ZT, Wang JR, Yang HF. 2001. Progress, problem and prospect of wheat sharp eyespot research. *Journal of Triticeae Crops*, 21(1): 81–84 (in Chinese) [韩月澎, 陈秀兰, 何震天, 王锦荣, 杨鹤峰. 2001. 小麦纹枯病研究现状、问题与展望. *麦类作物学报*, 21(1): 81–84]
- Lemańczyk G, Kwaśna H. 2013. Effects of sharp eyespot (*Rhizoctonia cerealis*) on yield and grain quality of winter wheat. *European Journal of Plant Pathology*, 135(1): 187–200
- 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 W, Sun HY, Deng YY, Zhang AX, Chen HG. 2014. The heterogeneity of the rDNA-ITS sequence and its phylogeny in *Rhizoctonia cerealis*, the cause of sharp eyespot in wheat. *Current Genetics*, 60(1): 1–9
- Liu HF, Liu SJ, Ding Y, Zhao QJ, Li RY, Yang F. 2020. *Rhizoctonia solani* to hexaconazole: sensitivity and resistance monitoring. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 36(13): 131–135 (in Chinese) [刘惠芳, 刘世江, 丁怡, 赵琪君, 李荣玉, 杨帆. 2020. 水稻纹枯病菌对己唑醇的敏感性及其抗性监测. *中国农学通报*, 36(13): 131–135]
- Lu Y. 2017. Studies on controlling sharp eyespot of wheat by seed coating of pyraclostrobin. Master thesis. Tai'an: Shandong Agricultural University (in Chinese) [芦勇. 2017. 吡唑醚菌酯拌种防治小麦纹枯病的研究. 硕士学位论文. 泰安: 山东农业大学]
- Meng RJ, Wang WQ, Wu J, Han XY, Zhou DW, Ning ZY. 2018. Synergistic interaction and field control effect of mixtures of thifluzamide with azoxystrobin against *Rhizoctonia solani*. *Journal of Plant Protection*, 45(2): 367–372 (in Chinese) [孟润杰, 王文桥, 吴杰, 韩秀英, 周大伟, 宁昭玉. 2018. 噻呋酰胺与嘧菌酯混配对马铃薯黑痣病菌增效作用及其田间防效. *植物保护学报*, 45(2): 367–372]
- Mu W, Wang Z, Bi Y, Ni X, Hou Y, Zhang S, Liu X. 2017. Sensitivity determination and resistance risk assessment of *Rhizoctonia solani* to SDHI fungicide thifluzamide. *Annals of Applied Biology*, 170(2): 240–250
- Shen RP, Song YY, Wang QH, Liu F. 2014. Compare of fungistasis of two new succinate dehydrogenase inhibitor. *Pesticide Science and Administration*, 35(8): 52–57 (in Chinese) [申瑞平, 宋莹莹, 王秋红, 刘峰. 2014. 两种新型琥珀酸脱氢酶抑制剂的抑菌活性比较. *农药科学与管理*, 35(8): 52–57]
- Shi XJ, Ren L, Wang HJ, Han JY. 2019. Sensitivity of early blight pathogen *Alternaria solani* to difenoconazole and fitness of resistant mutants. *Journal of Plant Protection*, 46(1): 201–207 (in Chinese) [史晓晶, 任璐, 王华杰, 韩佳音. 2019. 山西省番茄早疫病菌对苯醚甲环唑的敏感性及其抗性突变体的适合度. *植物保护学报*, 46(1): 201–207]
- Shi XJ, Zhou EC, Ren L, Han JC, Liang B, Liu HP. 2016. Sensitivity baseline of *Alternaria solani* to pyrisoxazole and the mode of action of pyrisoxazole. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 18(4): 453–458 (in Chinese) [史晓晶, 周恩超, 任璐, 韩巨才, 梁彬, 刘慧平. 2016. 番茄早疫病菌对啶菌噁唑敏感基线建立及药剂作用方式初探. *农药学报*, 18(4): 453–458]
- Sneh B, Jabaji-Hare S, Neate S, Dijst G. 1996. *Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 37–47
- Song LM, Zhang JM. 2013. Sensitivity of *Rhizoctonia cerealis* to flutolanil. *Journal of Triticeae Crops*, 33(6): 1284–1288 (in Chinese) [宋立妹, 张军民. 2013. 小麦纹枯病菌对氟吡酰胺的敏感性. *麦类作物学报*, 33(6): 1284–1288]
- Toda T, Hyakumachi M, Suga H, Kageyama K, Tanaka A, Tani T. 1999. Differentiation of *Rhizoctonia* AG-D isolates from turfgrass into subgroups I and II based on rDNA and RAPD analyses. *European Journal of Plant Pathology*, 105: 835–846
- Wang HX, Wang KY, Jiang XY, Yi MQ. 2001. Advances of wheat sharp eyespot. *Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science)*, 32(2): 267–270 (in Chinese) [王怀训, 王开运, 姜兴印, 仪美芹. 2001. 小麦纹枯病的研究进展. *山东农业大学学报(自然科学版)*, 32(2): 267–270]
- White TJ, Bruns TD, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct se-

- quencing of fungal ribosomal RNA genes.//Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. PCR protocols: a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, pp. 315-322
- Xu JQ, Ping ZL, Dang W, Li H, He DM, Zhu YG. 2017. Sensitivity of *Rhizoctonia cerealis* to jinggangmycin and tolclofos-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. 2017. 中国河南省小麦纹枯病菌对井冈霉素及甲基枯磷的敏感性. 农药学报, 19(1): 25-31]
- Xu JQ, Xia YF, Huang YL, Ma SC, Xu DC, Zheng W. 2018a. Etiology identification and sensitivity of the pathogen of wheat sharp eyespot to triadimefon in Henan Province. Journal of Plant Protection, 45(3): 423-431 (in Chinese) [徐建强, 夏彦飞, 黄宇龙, 马世闯, 许道超, 郑伟. 2018a. 河南省小麦纹枯病原菌鉴定及其对三唑酮的敏感性. 植物保护学报, 45(3): 423-431]
- Xu JQ, Zhao JJ, Hu XH, Wu YY, Yang GF, Fan QQ. 2018b. Biological characteristics of *Rhizoctonia cerealis* isolates with different sensitivities to triadimefon and their sensitivity to different fungicides. Journal of Plant Protection, 45(2): 359-366 (in Chinese) [徐建强, 赵建江, 胡雪涵, 吴亚云, 杨改凤, 范倩倩. 2018b. 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. 植物保护学报, 45(2): 359-366]
- Yang LL, Liu WW, Liu YQ, Mu W, Liu F. 2007. Baseline sensitivity and acquisition of resistance of *Sphaerotheca fuliginea* to hexaconazole in lab. Journal of Plant Protection, 34(4): 431-435 (in Chinese) [杨连来, 刘玮玮, 刘跃群, 慕卫, 刘峰. 2007. 黄瓜白粉病菌对己唑醇的敏感基线及实验室抗性获得. 植物保护学报, 34(4): 431-435]
- Yu DZ, Yang XJ, Yang LJ. 2000. Study on pathogenic anastomosis group of *Rhizoctonia* causal agent of sharp eyespot of wheat in Hubei Province. Hubei Agricultural Sciences, 39(3): 39-42 (in Chinese) [喻大昭, 杨小军, 杨立军. 2000. 湖北省小麦纹枯病原菌丝融合群研究. 湖北农业科学, 39(3): 39-42]
- Yu JF, Zhang TY, Zhang XG. 2007. Genetic and virulence variation of wheat sharp eyespot isolates (*Rhizoctonia cerealis* AG-D) from Shandong Province. Acta Phytopathologica Sinica, 37(4): 418-425 (in Chinese) [于金凤, 张天宇, 张修国. 2007. 山东小麦纹枯病菌致病性与遗传分化关系的研究. 植物病理学报, 37(4): 418-425]
- Yu XL, Wang PS, Zhang W, Chen M, Wang YZ. 2017. Composition and virulence variation of the pathogen of wheat sharp eyespot from Yantai. Heilongjiang Agricultural Sciences, (4): 43-47 (in Chinese) [于晓丽, 王培松, 张伟, 陈敏, 王英姿. 2017. 烟台地区小麦纹枯病原菌群体组成与致病力分化. 黑龙江农业科学, (4): 43-47]
- Zhang Y, Lu JL, Wang JX, Zhou MG, Chen CJ. 2015. Baseline sensitivity and resistance risk assessment of *Rhizoctonia cerealis* to thi-fluzamide, a succinate dehydrogenase inhibitor. Pesticide Biochemistry and Physiology, 124: 97-102
- Zhu MD, Liu XA. 1988. Preliminary study on the identification and biological specialty of the pathogen of sheath blight of wheat in Henan Province. Journal of Henan Agricultural University, 22 (3): 332-338 (in Chinese) [朱明德, 刘新安. 1988. 河南省小麦纹枯病原菌鉴定及其生物学特性的初步研究. 河南农业大学学报, 22(3): 332-338]

(责任编辑:李美娟)