

烟台地区小麦纹枯病病原菌群体组成与致病力分化

于晓丽,王培松,张 伟,陈 敏,王英姿

(山东省烟台市农业科学研究院,山东 烟台 265500)

摘要:为了促进小麦纹枯病的防治,从烟台各县市区共采集分离小麦纹枯病菌菌株40个,通过细胞核染色、菌丝融合反应、rDNA-ITS序列分析测定得到的纹枯病菌的群体组成;通过室内试验测定菌株生长速率及致病力,比较不同地区小麦纹枯病菌的生长速率和致病力差异,并对其相关性进行分析。结果表明:烟台纹枯病菌菌株属于AG-D、AG-4和AG-5三个融合群,分别占总菌株数的92.5%、5.0%和2.5%;小麦纹枯病菌的生长速率在 $5.33\sim 13.00\text{ mm}\cdot\text{d}^{-1}$,分为快速、中速和慢速三种生长类型,分别占总株数的55.0%、40.0%和5.0%;随机选取的AG-D融合群20个菌株通过室内试验测定其致病力,病情指数在16.67%~68.25%,分为强毒力、中等毒力和弱毒力菌株三个等级;进一步的线性分析发现烟台地区小麦纹枯病菌生长速率与致病力之间成中等程度正相关性。

关键词:小麦纹枯病;生长速率;致病力;融合群

中图分类号:S435.121.4⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2017)04-0043-05 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2017.04.0043

小麦纹枯病已成为影响和制约小麦产量和品质的重要病害之一。小麦纹枯病的病原菌有双核的禾谷丝核菌(*Rhizoctonia cerealis* Vander

Hoeven)和多核的立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)两种。我国小麦纹枯病病原菌主要是禾谷丝核菌,另有少量立枯丝核菌。禾谷丝核菌主要有CAG-1、CAG-3、CAG-6和AGC1共4个菌丝融合群,以CAG1(AG-D)为主,立枯丝核菌主要有AG4和AG5融合群^[1]。不同病原菌的rDNA内转录区(ITS)可用于反映菌株间的进化关系和双核丝核菌菌种的分类^[2]。许多研究表明,小麦纹枯病菌不同融合群和同一融合群的不同菌株的致病力不同,不同地区菌株间致病力也有差异^[3-5]。

烟台是山东省重要的冬小麦产区之一。随着

收稿日期:2017-02-24

基金项目:烟台市科技发展计划资助项目(2013NC327, 2014NC107);国家现代农业产业技术体系资助项目(CARS-3-2-23)

第一作者简介:于晓丽(1982-),女,山东省莱西市人,博士,农艺师,从事植物病原菌致病机理及防控技术研究。E-mail: yuxiaoli92jn@126.com。

通讯作者:王英姿(1962-),女,山东省荣成市人,学士,研究员,从事植物病虫害防控技术研究。E-mail: ytnkyzbs@126.com。

Selection of the Artificial Diets of *Corcyra cephalonica*

HUANG Wen-gong¹, ZHANG Shu-quan¹, LIU Yan¹, CHEN Si¹, YAO Yu-bo¹, REN Chuan-ying², YUAN Xiao-hua³

(1. Industrial Crops Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086; 2. Food Processing Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086; 3. Sericultural Research Institute of Heilongjiang, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: In the light of present situation of poor in the diets of *Corcyra cephalonica* and limited in research foundation, screening the artificial diets of *Corcyra cephalonica* was carried out. The growth and fecundity of *Corcyra cephalonica* were studied on five artificial diets. There was shorter growth cycle (35 d) and higher total number of emergence (4 969 adults) for *C. cephalonica* on diet E (70% corn flour + 20% rice bran + 7% sugar + 3% yeast) than on diets A (94% rice bran + 3% sugar + 3% yeast), B (97% rice bran + 3% sugar), C (100% rice bran) and D (70% rice bran + 24% rice bran + 3% sugar + 3% yeast), respectively. In addition, the bodyweight of female adults and male adults reared by diet E (40.47 and 16.70 mg) which was significantly higher than those by the other four diets. The female adults from diet E had the largest number of oviposition (503 eggs). Taken together, the best optimal was diets E.

Keywords: artificial diet; *Corcyra cephalonica*; artificial feeding

小麦连作年限的增加、氮肥用量的增加及种植密度的提高,小麦纹枯病的发生日趋严重。2013-2015年,烟台地区小麦纹枯病每年发生面积均在6.7万 hm^2 以上,占发生总面积的40%左右,是烟台地区小麦的主要病害。本研究采集分离了烟台不同县市区小麦纹枯病菌菌株,并对菌株的分类、融合群、生长速率和致病力等进行测定,确定烟台地区小麦纹枯病菌的遗传分化,旨在为烟台地区小麦纹枯病的防治、遗传育种等提供理论基础和技术指导。

1 材料与方法

1.1 材料

2015年,在小麦品种烟农15拔节期,从烟台市牟平区、栖霞市、福山区、海阳市、莱阳市、莱州市、招远市、龙口市、蓬莱市、莱山区共10个县市区采集典型的小麦纹枯病病样,以其做为供试材料进行试验。

1.2 方法

1.2.1 小麦纹枯病菌菌株的分离 将采集来的小麦纹枯病病样,采用组织分离法^[6],取感病小麦茎部病健交界处,用手术刀片切取5 mm^2 的小片组织,用次氯酸钙消毒液(10g次氯酸钙,140mL无菌水)消毒,用无菌水清洗3次后用无菌滤纸将水分吸干,放置于PDA平板培养基上,25℃黑暗培养。3d后用灭菌的挑针挑取分离得到的菌落边缘菌丝至新的PDA平板进行纯化,并将纯化的病原菌低温保存。

1.2.2 小麦纹枯病菌菌株多核、双核测定 将培养3d的待测菌株用5% KOH-Safranin O溶液进行细胞核快速染色1~3min^[7-8],显微镜下观察并确定其为多核或双核。

1.2.3 菌丝融合测定 参照 Parmeter 等^[9]的方法对分离得到的菌株融合型进行测定。标准测试菌株采用 AG-D、AG-A、AG-G、AG-E 四个双核菌株,AG-3、AG-4、AG-5 三个多核菌株。

1.2.4 纹枯病菌株 rDNA-ITS 序列的扩增、测序和比对 用天根基因组提取试剂盒提取分离的40个小麦纹枯病菌菌株的基因组。采用真菌 rDNA-ITS PCR 扩增通用引物 ITS1 (5'-TCCG-TAGGTGAACCTGCG-3') 和 ITS4 (5'-TC-CTCCGCTTATTGATATGC) 扩增待测菌株的 rDNA-ITS DNA 序列片段。PCR 扩增反应体系为:94℃预变性2min;94℃变性1min,59℃退火1min,72℃延伸1min,25个循环;72℃充分

延伸5min,4℃保存。PCR产物纯化回收后,送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。在NCBI中进行同源序列(BLAST)比对分析。

1.2.5 待测菌株生长速率测定 取新鲜培养的纹枯病菌菌株,用直径6mm无菌打孔器打取待测纹枯病菌菌株菌落边缘菌饼接种到直径为90mm的PDA培养基平板正中央,将培养皿倒置培养于25℃的培养箱,6d后十字交叉法测量菌落的直径,每个菌株重复3次,计算菌株的平均生长速率;采用欧氏距离中的非加权组平均法(UP-GMA)对不同菌株生长速率进行聚类分析,将菌株按照生长速率分为不同等级。

1.2.6 待测菌株致病力测定 从采集分离的不同县市区纹枯病菌菌株中随机选取了20个菌株,采用带病麦粒接种法接种温室盆栽苗,测定其对烟农15品种小麦的致病力。

具体方法为:将用清水浸泡1昼夜后的小麦籽粒放在锅中煮熟后置于三角瓶中高压灭菌(121℃,2h),接入活化后的纹枯病菌菌株,置于25℃的培养箱中培养20d,每隔2~3d振摇三角瓶1次,使病菌在麦粒上生长均匀。供试小麦种子播种于装有约1kg无菌土的外口径为11cm的塑料钵中,每钵播种15粒,正常栽培管理,待小麦长到三叶一心期接入带病菌麦粒,每个菌株3个重复,接种28d后调查病情。小麦病情指数越高,代表菌株致病力越强。

分级标准为:

0级:无症状;

1级:外层叶鞘有明显的纹枯病斑,但病斑周长小于1/2;

3级:外层叶鞘有明显的纹枯病斑,但病斑周长大于1/2;

5级:内层叶鞘有明显的纹枯病斑,但病斑周长小于1/2;

7级:内层叶鞘有明显的纹枯病斑,但病斑周长大于1/2;

9级:植株死亡。

2 结果与分析

2.1 病原菌菌丝融合群的测定

从烟台地区不同县市区共采集分离得到小麦纹枯病菌40株,通过番茄O染色试验、与标准菌株菌丝融合群测定和rDNA-ITS序列测序比对可确定:双核丝核菌37株,均属于AG-D融合群,占总供试菌株的92.5%;多核丝核菌3株,2

个属于立枯丝核菌 AG-4 融合群,占总供试菌株 的 5.0%,有 1 个属于立枯丝核菌 AG-5 融合群, 占总数的 2.5%(见表 1)。

表 1 小麦纹枯病菌采集地及菌丝融合群

Table 1 The locality and anastomosis groups of Rhizoctonia strains							
菌株编号 Strain No.	采集地 Locality	双核/多核 Binuclear/ Polynuclear	菌丝融合群 Anastomosis group	菌株编号 Strain No.	采集地 Locality	双核/多核 Binuclear/ Polynuclear	菌丝融合群 Anastomosis group
WK1501	福山区东陌堂村	双核	AG-D	WK1521	莱州平里店镇	双核	AG-D
WK1502	福山区东陌堂村	双核	AG-D	WK1522	龙口北马镇	双核	AG-D
WK1503	福山区高疃镇	双核	AG-D	WK1523	龙口北马镇	双核	AG-D
WK1504	海阳郭城镇	双核	AG-D	WK1524	龙口兰高镇	双核	AG-D
WK1505	海阳郭城镇	双核	AG-D	WK1525	龙口龙岗镇	双核	AG-D
WK1506	海阳里店镇	双核	AG-D	WK1526	龙口芦头镇	双核	AG-D
WK1507	海阳小纪镇	双核	AG-D	WK1527	龙口诸由观镇	双核	AG-D
WK1508	海阳徐家店镇	双核	AG-D	WK1528	牟平高陵镇	双核	AG-D
WK1509	莱山区沐浴村	双核	AG-D	WK1529	牟平区院格庄	双核	AG-D
WK1510	莱阳柏林庄镇	双核	AG-D	WK1530	蓬莱北沟镇	双核	AG-D
WK1511	莱阳柏林庄镇	多核	AG-4	WK1531	栖霞官道镇	多核	AG-4
WK1512	莱阳冯格庄镇	双核	AG-D	WK1532	栖霞桃村镇	双核	AG-D
WK1513	莱阳高格庄镇	双核	AG-D	WK1533	栖霞中桥镇	多核	AG-5
WK1514	莱阳姜疃镇	双核	AG-D	WK1534	招远玲玲镇	双核	AG-D
WK1515	莱阳姜疃镇	双核	AG-D	WK1535	招远玲玲镇	双核	AG-D
WK1516	莱阳团旺镇	双核	AG-D	WK1536	招远齐山镇	双核	AG-D
WK1517	莱阳万第镇	双核	AG-D	WK1537	招远齐山镇	双核	AG-D
WK1518	莱阳羊郡镇	双核	AG-D	WK1538	招远辛庄镇	双核	AG-D
WK1519	莱州城郭镇	双核	AG-D	WK1539	招远张星镇	双核	AG-D
WK1520	莱州金城镇	双核	AG-D	WK1540	招远张星镇	双核	AG-D

2.2 小麦纹枯病菌菌株生长速率的分析

对 40 个小麦纹枯病菌菌株生长速度进行测定,结果显示生长速率在 5.33~13.0 mm·d⁻¹。采用欧氏距离中的非加权组平均法(UPGMA)对不同菌株生长速率进行聚类分析(见图 1),当欧氏距离取 2.0 时,40 个供试菌株的生长速率被划分为快速、中速和慢速 3 种类型。其中小麦纹枯病菌生长速率为快速类型的菌株为 22 株,占测定菌株的 55.0%,菌株生长速率变幅为 10.83~13.00 mm·d⁻¹,平均生长速率为 11.72 mm·d⁻¹;生长速率为中速类型的菌株为 16 株,占测定菌株的 40.0%,菌株生长速率变幅为 8.00~10.50 mm·d⁻¹,平均生长速率为 9.50 mm·d⁻¹;生长速率为慢速的菌株为 2 株,占测定菌株的 5.0%,菌株生长速率均为 5.33 mm·d⁻¹。结果表明,烟台市小麦纹枯病菌以中、快生长速率类型

为主。

将菌株生长速率按采集地作图(见图 2),可知莱山和莱州分离得到的纹枯病菌菌落生长速率为快速类型;海阳、莱阳、龙口、牟平和栖霞菌株生长速率有快速和中速两种;蓬莱的菌株菌落为中速生长;福山菌株菌落有快速和慢速两种,以快速为主;招远的菌株菌落生长快速、中速和慢速均有,以快速为主。

2.3 小麦纹枯病菌菌株致病力的测定

从分离得到的 37 个 AG-D 菌株中随机选取 20 个菌株,测定对小麦品种烟农 15 的致病力。结果显示,不同小麦纹枯病菌菌株对小麦的致病力差异较大,病情指数在 16.67%~68.25%,其中分离自莱州城郭镇的 WK1519 菌株致病力最小,病情指数为 16.67%,分离自莱阳万第镇的 WK1517 致病力最强,病情指数为 68.25%(见

表 2)。

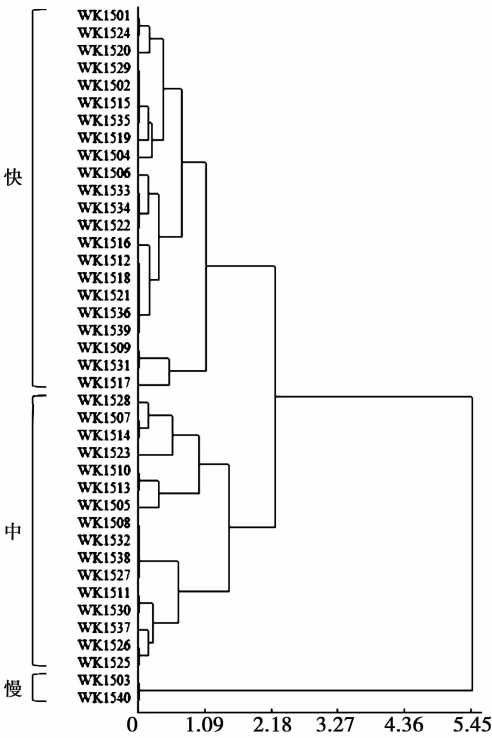


图 1 欧氏距离非加权组平均法(UPGMA)对 40 株小麦纹枯病菌菌落生长速率聚类分析

Fig. 1 Cluster analysis of colony growth rate of 40 Rhizoctonia strains with unweighted pair-group method with arithmetic means

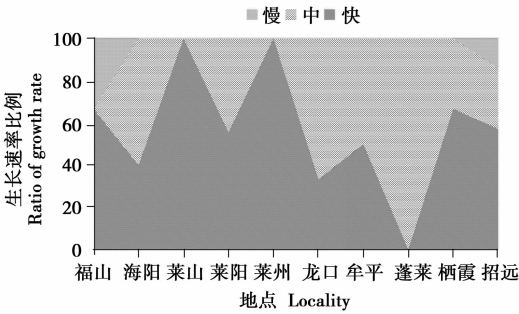


图 2 烟台各县市小麦纹枯病菌落生长速率比例

Fig. 2 Colony growth rate ratio of wheat sharp eyespot in different counties of Yantai

采用欧氏距离中的非加权组平均法(UPGMA)对不同菌株对小麦的致病力进行聚类分析(见图 3),当欧式距离取 15 时,20 个供试菌株的生长速率被划分为强毒力、中等毒力、弱毒力菌株三种类型。其中病情指数大于 47.00% 的 WK1517、WK1529、WK1509、WK1539 和 WK1508 等 5 个菌株为强毒力菌株;病情指数小于 20.00% 的 WK1526、WK1515 和 WK1519 等 3

个菌株为弱毒力菌株,病情指数介于 20.00%~47.00% 的 12 个菌株为中等毒力菌株。表明烟台市纹枯病菌株以中、强毒力菌株为主,占 85.00%。

表 2 不同小麦纹枯病菌菌株对小麦致病力的室内测定结果

Table 2 The results of pathogenicity of different Rhizoctonia strains to wheat in Laboratory test

菌株编号 Strain No.	病情指数/% disease index	菌株编号 Strain No.	病情指数/% disease index
WK1517	68.25	WK1512	37.78
WK1529	62.96	WK1524	37.37
WK1509	55.56	WK1530	36.51
WK1539	53.33	WK1536	31.11
WK1508	47.62	WK1538	30.56
WK1521	41.67	WK1525	29.29
WK1523	41.67	WK1506	28.89
WK1516	40.74	WK1526	18.06
WK1510	40.00	WK1515	17.46
WK1534	40.00	WK1519	16.67

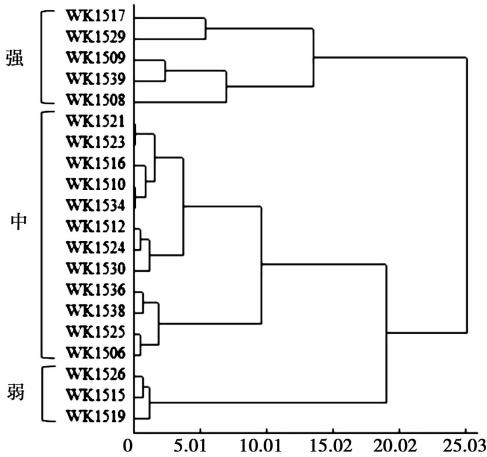


图 3 欧氏距离非加权组平均法(UPGMA)对不同小麦纹枯病菌菌株的致病力的聚类分析

Fig. 3 Cluster analysis of pathogenicity of 20 Rhizoctonia strains with unweighted pair-group method with arithmetic means

2.4 病菌致病力与生长速率的关系

对测定的 20 个菌株的生长速率和致病力进行相关性分析,得到拟合的直线相关方程为 $Y = 4.1282X - 5.9473$ (Y 为菌株的病情指数, X 为菌丝生长速率)(见图 4),其相关系数为 0.4321 ($P < 0.1$, 相关系数成立),说明两者之间存在中等正相

关性(相关系数在 0.3~0.7 的相关系数为“中等强度”),未达到强相关性,表明另外还存在其它影响因素,需要进一步深入研究。

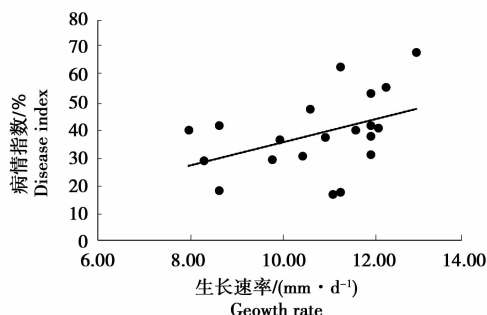


图 4 供试 20 个菌株的致病力与生长速率关系线性分析

Fig. 4 Linear analysis of the relationship between pathogenicity and growth rate of 20 tested strains

3 结论与讨论

小麦纹枯病的病原菌有核谷丝核菌和立枯丝核菌两种^[10]。不同病原菌又分属于不同融合群。我国小麦纹枯病菌以核谷丝核菌的 AG-D 融合群为主,还有少量菌株属于立枯丝核菌的 AG4、AG5 融合群,其中 AG-D 融合群菌株致病力最强^[2]。同一融合群内不同菌株间致病力也有明显差异^[3,11]。通过研究,确定了烟台地区小麦纹枯病的病原组成,主要以核谷丝核菌的 AG-D 融合群为主,有少量属于立枯丝核菌的 AG4、AG5 融合群,隶属于 AG-D 融合群的菌株致病力分化明显,可分为强致病力、中等致病力和弱致病力三个等级,其致病力的强弱与菌落生长速率呈中等强

度正相关性,说明还有其它未知因素决定其致病力的强弱,需要进一步进行研究。通过研究烟台地区小麦纹枯病的病原组成、菌丝融合群结构、致病力分化及遗传多样性,旨在为小麦抗病或耐病品种的合理布局或利用,以及对小麦纹枯病的防治提供理论依据,因此,本研究在理论和实际应用中均具有较大的意义。

参考文献:

- [1] 陈延熙,唐文华,张敦华,等.我国小麦纹枯病病原学的初步研究[J].植物保护学报,1986,13(1):39-44.
- [2] 陈怀谷,方正,陈厚德,等.小麦纹枯病菌核糖体基因内转录区序列比较[J].植物病理学报,2005,35(1):24-29.
- [3] 史建荣,王裕中,沈素文,等.江苏省小麦纹枯病菌致病力研究[J].江苏农业学报,1997(3):61-63.
- [4] 潘以楼,吴汉章.江苏小麦纹枯病菌(*Rhizoctonia cerealis* Vander Hoeven)CAG_1 群菌株的特性和致病力分化[J].江苏农业学报,1992(3):30-35.
- [5] 方正.小麦纹枯病菌的多样性和分子检测[D].扬州:扬州大学,2003.
- [6] 方中达.植病研究方法[M].北京:中国农业出版社,1998.
- [7] Yamamoto D T, Uchida J Y. Rapid Nuclear Staining of *Rhizoctonia solani* and Related Fungi with Acridine Orange and with Safranin O[J]. Mycologia, 1982, 74(1):145.
- [8] 黄江华,杨媚,周而勋,等.丝核菌细胞核染色技术的研究[J].仲恺农业工程学院学报,2001,14(4):13-17.
- [9] Parmeter J R J. Anastomosis grouping among isolates of *Thanatephorus cucumeris* [J]. Phytopathology, 1969, 59: 1270-1278.
- [10] Boerema G H, Verhoeven A A. Check-list for scientific names of common parasitic fungi[J]. European Journal of Plant Pathology, 1973, 78(5):1-55.
- [11] 岳红宾,王守正,袁红霞,等.河南丝核菌分组和致病性研究[J].河南农业大学学报,1997(2):103-108.

Composition and Virulence Variation of the Pathogen of Wheat Sharp Eyespot from Yantai

YU Xiao-li, WANG Pei-song, ZHANG Wei, CHEN Min, WANG Ying-zi

(Yantai Academy of Agricultural Science, Yantai, Shandong 265500)

Abstract: In order to promote the prevention and control of wheat sheath blight, a total of 40 *Rhizoctonia* isolates from different counties of Yantai was collected and isolated, the anastomosis groups by nuclear staining, hyphal fusion reaction and rDNA-ITS sequence analysis were determined, the growth rate and pathogenicity of different strains through measuring were compared. The results showed that the strains of wheat sharp eyespot in Yantai belonging to AG-D, AG-4 and AG-5 three fusion groups, comprising 92.5%, 5.0% and 2.5% respectively; the growth rate was between 5.33 to 13.0 mm·d⁻¹, dividing into three types: fast, medium and slow, comprising 55.0%, 40.0% and 5.0% respectively. The 20 strains of AG-D fusion group were randomly selected to determine their pathogenicity, and the disease index was between 16.67%~68.25%, which were divided into three grades: highly virulent, moderately virulent and weakly virulent strains; linear analysis revealed a positive correlation between growth rate and pathogenicity of *Rhizoctonia* strains in Yantai area.

Keywords: wheat sharp eyespot; growth rate; pathogenicity; anastomosis groups