麦类作物学报 2009,29(6):1110-1114
Journal of Triticeae Crops

中国北纬33度地区小麦纹枯病菌的群体组成及致病力研究

陈 莹[1,2],李 伟[2],张晓祥[3],张伯桥[3],于汉寿[1],陈怀谷[2]

(1. 南京农业大学农业部农业环境微生物工程重点实验室,江苏南京 210095; 2. 江苏省农业科学院植物保护研究所,江苏南京 210014;
3. 江苏里下河地区农业科学研究所,江苏扬州 225007)

摘 要:为明确中国北纬33度地区小麦纹枯病病原菌的组成和致病力,对分离自江苏、安徽、河南、湖北4省的157株丝核菌,通过Hoechst 33258荧光染色法进行细胞核数量观测,利用菌丝融合的方法测定其所属融合群,并测定了其中111株丝核菌株对3个小麦品种(CI12633、陕229、扬麦158)麦苗的致病力。结果表明,在供试菌株中,150株为双核丝核菌,占95.54%,都属于AG-D融合群;7株为多核丝核菌,占4.46%,其中3株属于AG-1-IB融合群,3株属于AG11融合群,1株属于AG5融合群。供试菌株的致病力存在明显差异,双核丝核菌的致病力显著高于多核丝核菌,AG-D融合群中两种不同融合频率的菌株致病力无明显差异。不同地区的菌株间致病力无明显差异,菌株对3个小麦品种的致病力有显著差异,对CI12633致病力最强,对陕229致病力最弱,对扬麦158的致病力居中。

关键词:小麦;丝核菌;纹枯病;群体组成;致病力

中图分类号:S512.1; S435.121.4+9 **文献标识码**:A **文章编号**:1009-1041(2009)06-1110-05

Composition and Virulence of Pathogen of Wheat Sharp Eyespot in North Latitude 33°of China

CHEN Ying[1,2], LI Wei[2], ZHANG Xiao-xiang[3], ZHANG Bo-qiao[3], YU Han-shou[1], CHEN Huai-gu[2]

(1. Key Laboratory of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China;
2. Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing, Jiangsu 210014, China;
3. Lixiahe Region Agricultural Science Research Institute of Jiangsu Province, Yangzhou, Jiangsu 225007, China)

Abstract: Wheat sharp eyespot is one of the most important diseases in the north latitude 33° regions of china. One hundred and fifty-seven *Rhizoctonia* isolates were isolated from different areas of Jiangsu, Anhui, Henan and Hubei province in 2008 and 2009. Identification results showed, among these isolates, 150 isolates were *Rhizoctonia cerealis* with percentage of 95.54%, and 7 isolates were *Rhizoctonia solani* with percentage of 4.46%. All *R. cerealis* isolates were in AG-D anastomosis group. Among the 7 isolates of *R. solani*, based on anastomosis and blast of their ITS sequences, one isolate was in AG5 anastomosis group, and 3 isolates were in AG11 and 3 isolates were in AG-1-IB, respectively. The virulence of 111 isolates was tested with artificial inoculation method in greenhouse. The results showed that virulence of these isolates was different significantly. The virulence of *R. cerealis* isolates was higher than that of *R. solani* isolates. No significant difference was observed between two *R. cerealis* AG-D groups with different anastomosis frequency. The virulence of isolates from 4 provinces was not significantly different. The virulence of isolates to 3 wheat cultivars was significantly different, and it was the highest to CI12633 and the lowest to Shaan 229.

Key words: Wheat; *Rhizoctonia*; Sharp eyespot; Group composition; Virulence

收稿日期:2009-06-12 修回日期:2009-08-25
基金项目:国家公益性行业科研专项资助项目(nyhyzx07-049);小麦产业技术体系建设项目(nycytx-03)。
作者简介:陈 莹(1982-),女,硕士研究生,主要从事微生物资源与分子生态学研究。E-mail:1104chenying@163.com
通讯作者:于汉寿(1964-),男,副教授,主要从事微生物资源与分子生态学研究。E-mail:yuhans@njau.edu.cn
陈怀谷(1964-),男,研究员,主要从事植物病害控制研究。E-mail:huaigu@jaas.ac.cn

由丝核菌侵染小麦引起的小麦纹枯病（Sharp eyespot of wheat）是一种世界性小麦病害，几乎遍布世界各温带小麦种植区。该病在中国冬麦区普遍发生，并成为黄淮平原及长江流域麦区的主要病害之一[1-3]。国内许多学者对小麦纹枯病病原菌进行了较深入地研究，表明引起江苏等地小麦纹枯病的病原菌有双核丝核菌的 AG-D 融合群（又名 CAG1 融合群或禾谷丝核菌 *Rhizoctonia cerealis* Van der Hoeven）和多核的立枯丝核菌（*Rhizoctonia solani* Kühn），其中禾谷丝核菌 AG-D 融合群属于优势种群，其次是立枯丝核菌 AG5、AG4、AG2 等融合群[4-7]。但对北纬 33 度地区其他省份小麦纹枯病病原菌组成和致病力的研究并不多见。本研究收集了江苏、安徽、河南、湖北 4 个省不同麦区的小麦纹枯病菌株，对其细胞核数目、菌丝融合群种类、病菌 rDNA-ITS 序列和致病力进行了系统研究，旨在明确北纬 33 度地区小麦纹枯病的病原组成，了解小麦纹枯病菌群体结构与致病性之间的关系。

1　材料与方法

1.1　菌株的收集、分离与鉴定

2008 和 2009 年春，从江苏、安徽、河南、湖北 4 个省的冬小麦田中采集了小麦纹枯病株。在室内采用常规组织分离法进行病原真菌的分离[8]，并对分离到的菌株进行了纯化及初步的形态学鉴定，共得到 157 株丝核菌菌株，并在 PSA 斜面上 4℃保存。双核丝核菌的 AG-D 融合群和立枯丝核菌的 AG5 融合群由江苏省农科院植保所保存；立枯丝核菌 AG-2-ⅢB 和 AG-1-IB 融合群由华南农业大学资源环境学院周而勋教授提供。

1.2　细胞核数目的观察

采用 Kangatharalingam 和 Ferguson 的荧光染色法[9]，并参照罗信昌[10]的菌丝培养方法，对菌丝染色 1 h，荧光显微镜下观察细胞核数目。

1.3　菌株融合群的鉴定

1.3.1　通过菌丝融合鉴定融合群

对双核丝核菌与 AG-D 标准融合群菌株进行菌丝融合测定，多核丝核菌与 AG5 和 AG-2-ⅢB 融合群标准菌株进行菌丝融合测定。将活化后的菌株与标准菌株同时从 PSA 上移到清洁玻片上，距离 1～2 cm，保湿，对峙培养。菌丝生长至前沿相互接触时，用番红 O-KOH 染色液染色，在显微镜下观察并统计融合频率[11-13]。

1.3.2　通过比对 rDNA-ITS 序列鉴定融合群

对多核丝核菌中与 AG5 和 AG-2-ⅢB 融合群标准菌株都不融合的菌株，通过 SDS 法提取其基因组 DNA，采用真菌通用引物 ITS1（5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′）和 ITS4（5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′）[14]直接扩增多核丝核菌总 DNA 中的 ITS 片段。PCR 扩增反应条件为：95℃ 预变性 3 min；95℃ 变性 30 s，58℃退火 1 min，72℃延伸 45 s，35 个循环；72 ℃充分延伸 10 min，最后 4℃保存。PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳检测并测序（华大生物公司）。在 GenBank 中进行同源性比较。

1.4　菌株致病力测定

取清水浸泡 2 d 后的小麦籽粒，置于三角瓶中高压灭菌（121℃，1 h），接入活化后的纹枯病菌菌株，25℃静置培养 20 d，每隔 2 d 振摇三角瓶以打碎结块的麦粒。

试验选扬麦 158、陕 229 和 CI12633 共 3 个小麦品种，将种子播种于装有 1 kg 无菌土的外口径为 16 cm 塑料钵中，每钵播 25 粒，正常栽培管理，待小麦长到三叶期接入带病菌麦粒，每个菌株 3 个重复，接种 4 周后调查病情。病情调查参照 Lipps 等人[15]的分级标准。计算病情指数，使用 DPS 7.05 软件对病情指数进行统计分析。

2　结果与分析

2.1　菌株的分离与鉴定

试验分离鉴定出丝核菌菌株 157 株，其中江苏省 58 株，安徽省 39 株，湖北省 24 株，河南省 36 株。

2.2　菌丝细胞核数目观察结果

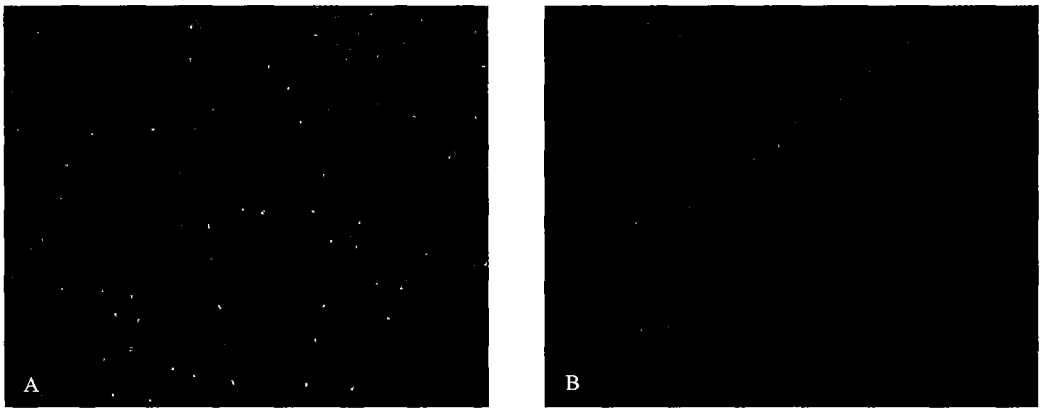
对 157 株菌株进行细胞核数目观察的结果（图 1）表明，150 株为双核丝核菌，占 95.54%；7 株为多核丝核菌，占 4.46%。

2.3　菌丝融合群鉴定结果

对 150 株双核丝核菌与标准融合群菌株 AG-D 进行菌丝融合群测试的结果表明，150 株供试菌株都与标准融合群菌株 AG-D 融合。按照菌丝融合群的划分方法，凡是可以融合的都可归为同一融合群。根据观察到的菌丝融合频率的高低，将它们分为 2 类，其中属于第 1 类的有 128 株，占 85.33%，菌丝融合频率高于 50%；属于第 2 类的有 22 株，占 14.67%，菌丝融合频率低于 50%（表 1）。

7 株多核丝核菌分别与融合群标准菌株 AG5、AG-2-ⅢB 进行菌丝融合群测试，结果表明，只有 1 株与 AG5 标准菌株融合，6 株多核丝核菌与融合群标准菌株 AG5 和 AG-2-ⅢB 都不融合。对 7 株多核丝核菌菌株 rDNA-ITS 序列进行了测定，结果表

明,3 株属于 AG-1-IB 融合群,3 株属于 AG11 融合群,1 株属于 AG5 融合群。将 3 株 AG-1-IB 融合群菌株与 AG-1-IB 标准融合群菌株进行融合测定,均与之发生融合。说明菌丝融合群测定结果与 ITS 序列比对的结果一致。



A:双核丝核菌;B:多核丝核菌 (标尺=20 μm)。
A: binucleate *Rhizoctonia*; B: multinucleate *Rhizoctonia* (Bar=20 μm).

图 1 菌丝细胞核数目的观察
Fig. 1 Observation of the nuclear number of *Rhizoctonia*s

表 1 双核丝核菌菌丝融合群鉴定结果
Table 1 Anastomosis of binucleate *Rhizoctonia* isolates

类别 Anastomosis type	融合状况 Anastomosis character		菌株数目 Number	百分率(%) Percentage
第一类 Type 1	融合频率 50%以上	Anastomosis frequency is above 50%	128	85.33
第二类 Type 2	融合频率 50%以下	Anastomosis frequency is less than 50%	22	14.67

2.4 菌株致病力测定结果

2.4.1 不同菌株间的致病力差异

接病原菌后 28 d,对扬麦 158、陕 229 和 CI12633 的病情指数调查结果表明,111 株丝核菌间致病力强弱有明显差异。禾谷丝核菌在 3 个小麦品种上平均病情指数较立枯丝核菌的高(表 2)。

表 2 禾谷丝核菌和立枯丝核菌对小麦致病力的比较
Table 2 Virulence comparison between *R. cerealis* and *R. solani*

菌株种类 Strains type	病情指数 Disease index			
	扬麦 158 Yangmai 158	陕 229 Shaan 229	CI12633	平均 Average
禾谷丝核菌 *R. cerealis*	60.04	38.21	69.71	55.99
立枯丝核菌 *R. solani*	11.26	6.99	16.00	11.42

从平均病情指数看,禾谷丝核菌为 55.99,立枯丝核菌为 11.42。与禾谷丝核菌致病力比较,7 株立枯丝核菌具有相对较弱的致病性,说明多数禾谷丝核菌对小麦具有较强的致病性,而立枯丝核菌也能引起小麦纹枯病,但致病力远不及禾谷丝核菌。

2.4.2 AG-D 中两种融合频率菌株间的致病力差异

从 AG-D 融合群内 2 类菌株(表 1)病情指数的平均数(表 3)来看,两种融合频率菌株间致病力在 5%显著水平上无差异,说明菌株间致病力差异与融合频率大小无相关性。

2.4.3 不同地区间菌株以及菌株对三个小麦品种的致病力差异

分别计算各地区菌株的病情指数的平均数,用 DPS 统计软件进行完全随机设计二因素无重复试验统计分析,比较地区间菌株致病力差异和菌株对三个小麦品种的致病力差异。结果(表 4)表明,地区间的菌株致病力在 5%显著水平上无显著差异;菌株对三个小麦品种的致病力在 5%显著水平上有显著差异,对 CI12633 致病力最强,对陕 229 致病力最弱,对扬麦 158 的致病力居中。

表 3　AG-D 中两种融合频率菌株间的致病力差异

Table 3　Virulence of different anastomosis frequency type of AG-D to three wheat cultivars

融合频率类型 Anastomosis frequency type	病情指数 Disease index			
	扬麦 158 Yangmai 158	陕 229 Shaan 229	CI12633	平均 Average
第一类 Type 1	59.93	37.96	69.16	55.68a
第二类 Type 2	60.80	39.94	73.58	58.11a

平均数后的小写字母表示差异显著性(0.05)，相同字母表示不显著。

The characters followed average refer to difference significant at 0.05 levels.

表 4　地区间菌株和菌株对三个小麦品种的致病力差异

Table 4　Virulence of *Rhizoctonia* isolates from different regions to 3 wheat cultivars

地区 Region	病情指数 Disease index			标准差 Standard deviation	平均病情指数 Average disease index
	扬麦 158 Yangmai 158	陕 229 Shaan 229	CI12633		
江苏 Jiangsu	58.39	34.76	66.69	16.57	53.28a
安徽 Anhui	56.46	38.65	67.05	14.35	54.06a
湖北 Hubei	52.44	39.06	58.38	9.90	49.96a
河南 Henan	52.41	29.47	70.78	20.70	50.89a
标准差 Standard deviation	2.99	4.45	5.23		
平均病情指数 Average disease index	54.92b	35.48c	65.73a		

平均数后的小写字母表示差异显著性(0.05)，相同字母表示不显著。

The characters followed average refer to difference significant at 0.05 levels.

3　讨　论

试验结果表明，引起中国北纬 33 度地区小麦纹枯病的病原菌主要是双核丝核菌中 AG-D 融合群（又名禾谷丝核菌 *R. cerealis*），少部分为立枯丝核菌，这与之前对小麦纹枯病菌的菌丝融合群鉴定结果基本一致[1-4,16-17]。各地菌株都以双核的禾谷丝核菌为主，但不同地区双核和多核两种丝核菌所占的比例稍有不同，其中安徽省的 39 株丝核菌中有 5 株属于多核丝核菌，所占比例最大，而河南省的 36 株丝核菌中则未发现有多核丝核菌。以往从小麦纹枯病样本中分离的多核丝核菌绝大多数属于 *R. solani* 的 AG5 和 AG2 融合群。本研究分离的多核丝核菌只有一株属于 AG5 融合群，在这 4 个省分离的小麦纹枯病菌中还发现有 AG11 次要菌丝融合群，这在其他文献中未见报道。对于多核丝核菌融合群的划分，针对现有的 AG5 和 AG-1-IB 融合群标准菌株，本试验结合了菌丝融合群测定和 ITS 序列的比对进行了分析研究，结果表明，两种方法所得结果相吻合。说明在待测融合群菌株较少和缺少融合群标准菌株的情况下，通过 ITS 区序列比对进行多核丝核菌融合群的分类也是有效的。

本研究和以往的研究结果[18-20]都表明，对于小麦这一单一寄主，引起小麦纹枯病的病原菌主要是双核的禾谷丝核菌 *R. cerealis* AG-D 融合群，即使有极少量的多核丝核菌，其致病力也非常弱。而对水稻纹枯病菌的研究中也发现，侵染水稻引起水稻纹枯病的主要是多核的立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani kühn*（= *Thanatephorus cucumeris*（Frank）Donk）AG-1 融合群[14,21]。说明丝核菌虽然是一个包含多类真菌的大的类群，但由于病原菌和寄主长期的协同进化，引起小麦和水稻的纹枯病的丝核菌种和融合群相对单一[22-24]，但对于引起小麦纹枯病的双核丝核 AG-D 融合群下病菌群体结构及其变化还有待于进一步的研究。

本研究对 AG-D 中两种融合频率菌株间的致病力差异的分析结果表明，二者之间无显著性差异。之前，方正等将 AG-D 融合群按照融合频率分为 4 类，其对小麦的致病力也无显著性差异[18]。说明小麦纹枯病优势致病融合群 AG-D 融合频率的划分与其致病力无相关性，因此认为通过划分融合频率分析小麦纹枯病菌的致病力差异并无必要性。菌株对 3 个小麦品种致病力在 5% 水平上有显著差异，说明不同小麦品种对丝核菌的抗性有所差异。在以往的田间抗性鉴定中，本试验的供试品种扬麦 158 为中感品种，陕 229 为较抗品种，CI12633 为抗性品种。但本次苗期致病力测定结果却表明 CI12633 对病原菌的抗性最弱，说明在小麦纹枯病菌致病力的鉴定中，室内苗期鉴定与田间成株期抗性鉴定的结果有一定的差异。初步分析其原因可能为，温室条件下，

在接种后的前期，为保证快速发病，室内湿度很大，CI12633 在苗期的植株较细，使其抗病性减弱。而 CI12633 在成株期则表现为植株较高、茎秆较细、节间较长和刚健，这些特性对病菌的侵染不利。而陕 229 和扬麦 158 的室内外的对病菌的抗性鉴定结果一致。因此，室内外抗性鉴定结果的一致性还需要在更多的品种上加以验证。

本研究再次证明禾谷丝核菌 *R. cerealis* 的 AG-D 融合群为小麦纹枯病菌的优势菌群，多核丝核菌中的 AG-1、AG-2、AG-5 融合群菌株在小麦纹枯病病株上也能检测到，但分离频率很低且致病力较弱。虽然小麦纹枯病菌菌丝融合群组成存在一定地域差异，但各地小麦纹枯病菌的优势菌群是一致的，都是双核的禾谷丝核菌 AG-D 融合群。因此，可将其作为抗病鉴定、抗源筛选和抗病育种的主要针对对象，并进行小麦抗纹枯病遗传和基因定位的研究。

参考文献：

[1]刘朝晖，张 旭，陆维忠. 小麦纹枯病的研究进展和对策[J]. 江苏农业学报，2000，16(3)：185-190.

[2]韩月澎，陈秀兰，何霞天，等. 小麦纹枯病研究现状、问题与展望[J]. 麦类作物学报，2001，21(1)：81-84.

[3]张会云，陈荣振，冯国华，等. 中国小麦纹枯病的研究现状与展望[J]. 麦类作物学报，2007，27(6)：1150-1153.

[4]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.

[5]史建荣，王裕中，陈怀谷，等. 小麦纹枯病菌的菌丝融合群及其致病力测定[J]. 江苏农业科学，1993(增刊)：25-29.

[6]杨小军，杨立军，赵永玉，等. 湖北省小麦纹枯病原菌菌丝融合群和致病力研究[J]. 华中农业大学学报，2000，19(2)：106-111.

[7]喻大昭，杨小军，杨立军. 湖北省小麦纹枯病病原菌菌丝融合群研究[J]. 湖北农业科学，2000(3)：39-42.

[8]方中达. 植病研究方法[M]. 北京：农业出版社，1979.

[9]Kangatharalingam N, Ferguson M W. A simple and rapid technique for fluorescence staining of *Fungal Nuclei*[J]. Current microbiology, 1984, 10: 99-103.

[10]罗信昌，陈大年. 食用真菌核荧光染色技术的研究[J]. 真菌学报，1990，9(1)：64-68.

[11]Parmeter J R, Sherwood R T, Platt W D. Anastomosis grouping among isolate of *Thanatephorus cucumeris*[J]. Phytopathology, 1969, 59: 1270-1278.

[12]生越明. *Rhizoctonia* 属真菌分类学的研究[J]. 日本植物病理学会报，1984，50(3)：307-309.

[13]Kronland W C, Stanghellini M E. Clean slide technique for the observation of anastomosis and nuclear condition of *Rhizoctonia solani*[J]. Phytopathology, 1988, 78: 820-822.

[14]Toshihiro H, Takeshi T. A new subgroup of *Rhizoctonia* AG-D, AG-D Ⅲ. obtained from Japanese Zoysia grass exhibiting symptoms of a new disease[J]. Plant Disease, 2006, 90: 1389-1394.

[15]Lipps P E, Herr L J. Etiology of *Rhizoctonia cerealis* in sharp eyespot of wheat [J]. Phytopathology, 1982, 72: 1574-1577.

[16]杨共强，王素霞，宋玉立，等. 河南省小麦纹枯病菌原及其致病性研究[J]. 河南农业科学，2002(10)：21-23.

[17]方 正. 小麦纹枯病菌的多样性和分子检测[D]. 扬州：扬州大学硕士论文，2003.

[18]方 正，陈怀谷，陈厚德，等. 江苏省小麦纹枯病病原组成及其致病力研究[J]. 麦类作物学报，2006，26(1)：117-120.

[19]Okubara P A, Schroeder K L, Paulitz T C. Identification and quantification of *Rhizoctonia solani* and *R. oryzae* using Real-Time polymerase chain reaction[J]. Phytopathology, 2008, 98(7): 837-847.

[20]Celeste C L, Marcello Z, R S David . Population structure of the rice sheath blight pathogen *Rhizoctonia solani* AG-1 IA from India[J]. European Journal of Plant Pathology, 2005, 112: 113-121.

[21]Bernardes de Assis, Peyer P, Rush M C. Divergence between sympatric rice- and soybean-infecting populations of *Rhizoctonia solani Anastomosis* Group-1 IA[J]. Phytopatholog, 2008(98): 1326-1333.

[22]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，1997，31(2)：103-108.

[23]邓振山，张宝成，孙志宏，等. 新疆北疆棉田立枯丝核菌不同菌丝融合群致病力的研究[J]. 植物保护，2006，32(4)：36-39.

[24]陈素清，吴 斌，刘光珍，等. 四川棉花立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani* kühn)菌丝融合群研究[J]. 西南农业学报，1998，12(1)：56-60.