

· 研究论文 ·

DOI: 10.16801/j.issn.1008-7303.2018.0094

山东省玉米纹枯病菌对噻呋酰胺的敏感性 及其抗性突变体的生物学性状

尚佃龙^{1,2}, 姜兴印^{*1,2}, 刘 玉¹, 孙秀英¹, 李向东¹, 张吉旺³

(1. 山东农业大学 植物保护学院, 山东 泰安 271018; 2. 山东省农药毒理与应用技术重点实验室,
山东 泰安 271018; 3. 山东农业大学 农学院, 山东 泰安 271018)

摘 要: 为明确山东省玉米纹枯病菌对噻呋酰胺的敏感性及其抗药性风险, 采用菌丝生长速率法分别测定了来自山东泰安、临沂、潍坊、莱芜、日照及青岛 6 个地区的 102 株玉米纹枯病菌对噻呋酰胺的敏感性。结果表明: 其 EC_{50} 值分布范围为 0.010~0.194 $\mu\text{g/mL}$, 平均 EC_{50} 值为 $(0.086 \pm 0.004) \mu\text{g/mL}$, 且敏感性呈连续单峰曲线分布。通过紫外诱导与药剂驯化的方法各获得 5 株耐药性菌株 (TA3-X2、TA17-X6、LY8-3、QD14-Y7 和 WF6-A2) 和 1 株抗性突变体 (QD2-Y4), 其抗性水平在 6.46~20.08 倍之间, 突变频率分别为 0.87% 和 0.52%。对抗性突变体生物学性状的研究表明, 紫外诱导获得的 5 株耐药性菌株其耐药性不能稳定遗传, 而经药剂驯化获得的 1 株抗性突变体 QD2-Y4 的抗药性可稳定遗传; 耐药性菌株 TA3-X2 的菌丝生长速率高于亲本菌株, 其余菌株与亲本菌株差异不明显; 5 株耐药性菌株和 1 株抗性突变体的菌丝干重和菌核干重均低于亲本菌株; TA3-X2、WF6-A2 及 QD2-Y4 的致病力低于亲本菌株, TA17-X6、LY8-3 及 QD14-Y7 的致病力与亲本菌株无明显差异。交互抗性测定表明, 噻呋酰胺抗性突变体与戊唑醇、丙环唑、咯菌腈、井冈霉素、苯醚甲环唑和多菌灵之间均无交互抗性, 与啶酰菌胺和氟唑菌苯胺之间则存在交互抗性。研究表明, 山东省 6 个地区的玉米纹枯病菌对噻呋酰胺比较敏感, 推测噻呋酰胺可作为防治玉米纹枯病的理想候选药剂。

关键词: 玉米纹枯病菌; 噻呋酰胺; 啶酰菌胺; 敏感性; 诱导抗性; 生物学性状; 交互抗性

中图分类号: S481.4; S482.2; TQ450.13 文献标志码: A 文章编号: 1008-7303(2018)06-0735-08

Sensitivity of *Rhizoctonia solani* to thifluzamide in Shandong Province and the biological characteristics of resistant mutants

SHANG Dianlong^{1,2}, JIANG Xingyin^{*1,2}, LIU Yu¹, SUN Xiuying¹,
LI Xiangdong¹, ZHANG Jiwang³

(1. College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Taian 271018, Shandong Province, China; 2. Key Laboratory of Pesticide Toxicology & Application Technique of Shandong, Taian 271018, Shandong Province, China; 3. College of Agronomy, Shandong Agricultural University, Taian 271018, Shandong Province, China)

Abstract: In order to clarify the sensitivity and resistance risk of *Rhizoctonia solani* to thifluzamide in

收稿日期: 2018-08-21; 录用日期: 2018-11-01.

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFD0200604); 山东省现代农业产业技术体系项目 (SDAIT-02-10); 山东“双一流”奖补项目 (SYL2017-XTTD11).

作者简介: 尚佃龙, 男, 硕士研究生, E-mail: 13320356@qq.com; *姜兴印, 通信作者 (Author for correspondence), 男, 博士, 副教授, 主要从事农药毒理及应用技术研究, E-mail: xyjiang@sdau.edu.cn

Shandong Province, 102 isolates of *R. solani* in 6 areas in Shandong, including Tai'an, Linyi, Weifang, Laiwu, Rizhao and Qingdao, were investigated using the mycelial growth rate method. The EC_{50} values of thifluzamide against different isolates of the pathogen ranged from 0.010 to 0.194 $\mu\text{g/mL}$, with an average EC_{50} value of (0.086 ± 0.004) $\mu\text{g/mL}$, which showed a single-peak curve distribution. Five drug-resistant isolates were obtained by UV induction and one resistant mutant was obtained by drug domestication. Their resistance levels ranged from 6.46 to 20.08. The mutation frequencies were 0.87% and 0.52%, respectively. Five drug-resistant isolates obtained by UV induction could not be stably inherited. While one mutant QD2-Y4 obtained by acclimation of the drug could be stably inherited. Studies on the biological traits of antagonistic mutants showed that the mycelial growth rate of TA3-X2 isolate was higher than that of the parent isolates, and no other obvious difference was detected. The dry weight of mycelium and the dry weight of sclerotia of the five resistant isolates and one resistant mutant were all lower than the parent isolates. The pathogenicity of TA3-X2, WF6-A2 and QD2-Y4 was lower than that of the parent isolates. However, the pathogenicity of TA17-X6, LY8-3 and QD14-Y7 was not significantly different from that of the parental isolates. There was no cross-resistance between thifluzamide and some other fungicides, including tebuconazole, propiconazole, fludioxonil, validamycin, difenoconazole and carbendazim. However, the cross-resistance among thifluzamide, boscalid and penflufen was observed. Overall, *R. solani* is sensitive to thiafufuramide in 6 areas of Shandong Province. It is speculated that thiafidamide can be used as an ideal candidate for controlling banded leaf sheath blight in corn.

Keywords: *Rhizoctonia solani*; thifluzamide; boscalid; sensitivity; resistance induction; biological characteristics; cross resistance

丝核菌属是全世界多种作物上的破坏性土壤病原体,可在腐生期利用土壤中的有机残留物以无菌菌丝体(菌丝或菌核)的状态存活^[1]。玉米纹枯病是由禾谷丝核菌 *Rhizoctonia cerealis*、立枯丝核菌 *R. solani* 及玉蜀黍丝核菌 *R. zeae* 等土壤习居菌群侵染引起的土传真菌病害。其中,立枯丝核菌是优势病原菌^[2-3],主要菌群包括 AG-1-IA、AG-1-IB、AG-3、AG-5、AG-A 和 AG-K,其中 AG-1-IA 的分离株较易引起玉米纹枯病^[4]。玉米作为世界农业经济中重要的谷类作物,对提高粮食产量具有重要意义,但由于纹枯病的逐年加重,导致其品质和产量下降,带来严重的经济损失^[5]。目前玉米纹枯病主要防治措施以化学防治为主,常用药剂有三唑酮及井冈霉素等,随着其大量使用,药剂对病原菌的选择压力显著增加。已有关于立枯丝核菌对井冈霉素表现出抗性的报道^[6],导致药剂防效下降。

杀菌剂噻呋酰胺(thifluzamide)又称噻氟菌胺,是美国孟山都公司研制、陶氏益农公司开发的噻唑酰胺类琥珀酸脱氢酶抑制剂(SDHIs)^[7],兼

具保护和治疗作用,内吸性良好,可用于叶面喷雾或土壤处理。噻呋酰胺主要用于防治担子菌引起的病害,如丝核菌对水稻、马铃薯、玉米及花生等作物的为害。已有研究表明,噻呋酰胺用于水稻苗床处理时以 200~300 g/hm^2 剂量的效果较好^[8];采用喷淋浇灌法时 240 g/L 噻呋酰胺悬浮剂对花生白绢病的防治效果较好,且对花生安全^[9];用于谷类作物和草坪等的茎叶处理时,用药量以 125~250 g/hm^2 最为适宜。

齐永志等^[10]通过紫外诱导获得 5 株小麦纹枯病菌 *R. cerealis* 对噻呋酰胺的抗性突变体,但发现其抗性均不能稳定遗传。王成凤^[11]通过检测 2008、2010 和 2013 年小麦纹枯病菌对噻呋酰胺的敏感性,认为小麦纹枯病菌对噻呋酰胺抗性风险较低。目前噻呋酰胺尚未被正式用于田间玉米纹枯病的防治,亦未见相关研究报道,因此建立玉米纹枯病菌对噻呋酰胺的敏感基线,探究其对噻呋酰胺产生抗性突变的可能性及所获抗药性突变体的生物学性状,及时准确评估玉米纹枯病菌对噻呋酰胺的抗性风险甚为必要。

本研究尝试建立了山东省玉米纹枯病菌对噻呋酰胺的敏感基线, 并通过紫外诱导及药剂驯化方法分别对病原菌进行抗性诱导, 探究了抗性菌株的生物学性状, 旨在评估玉米纹枯病菌对噻呋酰胺的抗药性风险, 为噻呋酰胺在玉米病害防治上的科学合理应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

菌株: 2016—2017 年在山东省泰安 (TA)、临沂 (LY)、潍坊 (WF)、莱芜 (LW)、日照 (RZ) 及青岛 (QD) 6 个地区采集玉米纹枯病发病叶鞘、病叶、茎秆, 经分离纯化获得 102 株玉米纹枯病病原菌, 经细胞核观察染色和菌丝融合群测定, 确定其均为立枯丝核菌 *R. solani*, 转接于马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 培养基上, 于 4 °C 冰箱中保存。

供试玉米品种: 郑单 958 (河南金博士种业股份有限公司)。

药剂: 96% 噻呋酰胺 (thifluzamide) 原药 (山东康乔生物科技有限公司); 94.7% 戊唑醇 (tebuconazole) 及 95% 丙环唑 (propiconazole) 原药 (山东潍坊润丰化工股份有限公司); 97% 咯菌腈 (fludioxonil) 及 97% 啶酰菌胺 (boscalid) 原药 (陕西美邦药业集团股份有限公司); 95% 苯醚甲环唑 (difenoconazole) 原药 (山东东泰农化有限公司); 95% 多菌灵 (carben-dazim) 原药 (山东华阳农药化工集团有限公司); 64% 井冈霉素 (validamycin) 原药 (浙江钱江生物化学股份有限公司); 95% 氟唑菌苯胺 (penflufen) 原药 [拜耳作物科学 (中国) 有限公司]。

培养基: PDA 固体培养基 (马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂粉 15 g, 蒸馏水 1 L); PDB 液体培养基 (马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 蒸馏水 1 L); WA 培养基 (琼脂粉 10 g, 蒸馏水 1 L)。

1.2 试验方法

1.2.1 玉米纹枯病菌对噻呋酰胺敏感基线的建立

采用菌丝生长速率法^[12]测定山东省 6 个地区的 102 株玉米纹枯病菌对噻呋酰胺的敏感性, 尝试建立敏感基线。用丙酮溶解原药, 并用含体积分数为 0.1% 吐温-80 的灭菌去离子水配制成 500 $\mu\text{g/mL}$ 的母液, 继而稀释配制成噻呋酰胺质量浓度分别为 1、0.5、0.25、0.125、0.062 5 $\mu\text{g/mL}$ 的系列含药 PDA 平板, 以加入同体积灭菌去离子水的 PDA 平板为对照。于活化完全的菌落边缘打取直径为

5 mm 的菌饼, 菌丝面朝下接种至 PDA 平板上。每处理重复 4 次, 置于 25 °C 生化培养箱中培养 3 d 后, 采用十字交叉法测量菌落直径, 计算菌丝生长抑制率, 并建立毒力回归方程, 得到有效抑制中浓度 (EC_{50}) 值。试验重复 2 次。

1.2.2 玉米纹枯病菌抗噻呋酰胺突变体的获得

药剂连续选择驯化: 从山东泰安 (TA)、临沂 (LY)、潍坊 (WF)、莱芜 (LW)、日照 (RZ) 及青岛 (QD) 6 个地区随机选取 12 株玉米纹枯病菌作为亲本菌株, 于 PDA 平板上、25 °C 生化培养箱培养 2~3 d, 打取直径为 5 mm 的菌饼, 菌丝面向下转接于含 EC_{50} 浓度以上噻呋酰胺的 PDA 平板上, 每代选取生长较快的菌落进行转接, 直至抗性突变体能在含 0.5 $\mu\text{g/mL}$ (最低抑菌浓度, MIC) 噻呋酰胺的 PDA 平板上较好地生长为止。试验重复 4 次, 每重复为 4 皿。观察诱变菌株对噻呋酰胺的抗性变化, 按式 (1) 及式 (2) 计算各抗药突变体的抗性水平和抗性突变频率^[13]。

$$\text{RL}/\% = \text{EC}_{50(\text{R})}/\text{EC}_{50(\text{S})} \quad (1)$$

$$\text{RMF}/\% = \text{RN}/\text{TN} \times 100 \quad (2)$$

式中: RL 为抗性水平 (%); $\text{EC}_{50(\text{R})}$ 为抗药性突变体 EC_{50} 值 ($\mu\text{g/mL}$); $\text{EC}_{50(\text{S})}$ 为亲本菌株 EC_{50} 值 ($\mu\text{g/mL}$); RMF 为抗性突变频率; RN 为抗性突变体菌饼数; TN 为驯化菌饼总数。

紫外诱导: 参照 Bruin 等^[14]及夏晓明^[15]的方法并加以改进。待菌株培养稳定后, 打取直径为 5 mm 的菌饼, 转接于空白 PDA 平板上, 培养 24 h 后, 置于已预热 15 min 的紫外灯 (20 W, 254 nm) 下 20 cm 处分别照射 40、60、80、100、120、140 和 160 s, 以未进行紫外灯照射的亲本菌株作为对照。25 °C 黑暗条件下培养 3 d 后, 调查不同时间的致死率, 得出 95% 菌落致死的时间。选取 12 株亲本菌株, 培养 24 h 后, 相同条件下紫外照射 95% 菌落致死时间后, 25 °C 黑暗条件下培养 3 d, 观察菌丝生长状况。每亲本菌株接种 12 皿, 每皿 4 块菌饼。将平板上长出的不规则扇形角突变转移到 WA 培养基上, 显微镜下切取单细胞菌丝进行菌株纯化。将纯化后的菌丝转接到含 MIC 浓度噻呋酰胺的 PDA 平板上, 能够较好生长的菌株即为抗药性突变体。以未经紫外照射的亲本菌株作为对照, 分别按式 (1) 和式 (3) 计算抗药性突变体的抗性水平和突变频率。

$$\text{RMF}/\% = \text{AN}/\text{TN} \times 100 \tag{3}$$

式中：AN 为出现角突变菌丝块数。

1.2.3 抗性突变体的生物学性状研究

1.2.3.1 抗性遗传稳定性 将诱导获得的抗性突变体及亲本菌株在不含噻唑酰胺的 PDA 平板上依次继代培养 12 代，采用菌丝生长速率法分别测定 F₀、F₃、F₆、F₉ 及 F₁₂ 代对噻唑酰胺的敏感性 (EC₅₀ 值)，分析抗性突变体的抗药性能否稳定遗传。

1.2.3.2 抗性突变体生长速率及菌核的形成 将抗性突变体及亲本菌株于 PDA 培养基上 25 ℃、黑暗条件下培养 3 d 后备用。沿菌落边缘打取直径 5 mm 的菌饼，转接到空白 PDA 培养基平板上，置于 25 ℃ 生化培养箱中黑暗培养 2 d，其间每隔 12 h 测量 1 次菌落直径。每菌株重复 3 次，比较抗性突变体与亲本菌株菌丝生长速率差异。继续培养至 9 d 后，观察菌核形成情况，收集各皿菌核于 80 ℃ 烘干至恒重，比较抗性突变体与亲本菌株菌核干重差异。同时分别将抗性突变体及亲本菌株接种至 100 mL PDB 液体培养基中 (因病原菌生长速率较快，每瓶仅需接种 2 个直径为 5 mm 的菌丝块)，于 25 ℃、120 r/min 下振荡培养 3 d，菌丝通过布氏漏斗过滤，80 ℃ 烘干，称量菌丝干重。每菌株重复 3 瓶。

1.2.3.3 抗药性突变体的致病力 采用温室苗期菌饼接种法测定^[16]。于 25 ℃ 温室中将玉米培养到 3 叶 1 心期，将 PDA 平板上培养 3 d 后的抗性突变体及亲本菌株菌饼 (直径 5 mm) 接种到玉米第 1 叶鞘内，每个菌株接种 15 株玉米。每天进行喷雾保湿，保证土壤表面湿润，观察记录玉米生长及病害发展情况，15 d 后进行病害调查，统计发病级数，计算病情指数。病害分级方法^[16]：0 级，未发病；1 级，第 1 叶鞘发病；2 级，第 2 叶鞘发病；3 级，第 3 叶鞘发病；4 级，第 3 叶鞘以上发病或死亡。

1.2.3.4 交互抗药性测定 分别配制含系列质量浓度戊唑醇 (0.031 25、0.062 5、0.125、0.25、0.5、1 μg/mL)、丙环唑 (0.037 5、0.075、0.15、0.3、0.6、0.8 μg/mL)、咯菌腈 (0.012 5、0.025、0.05、0.1、0.2、0.4 μg/mL)、苯醚甲环唑 (0.025、0.05、0.1、0.2、0.4、0.8 μg/mL)、多菌灵 (0.5、1、2、4、6、8 μg/mL)、井冈霉素 (0.1、0.2、0.4、0.8、1.2、1.6 μg/mL)、啶酰菌胺 (0.05、0.1、0.2、0.4、0.8、1.2、1.6 μg/mL) 及氟唑菌苯胺 (0.025、

0.05、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 μg/mL) 的 PDA 平板，采用菌丝生长速率法测定抗噻唑酰胺突变体及亲本菌株对以上药剂的敏感性。将噻唑酰胺对抗性突变体及亲本菌株的 EC₅₀ 值分别作为 *x* 轴，其他几种药剂对突变体及亲本菌株的 EC₅₀ 值分别作为 *y* 轴，进行线性回归分析，得出回归方程、决定系数 (*R*²) 及 *P* 值，分析噻唑酰胺与其他药剂之间的交互抗性关系^[10]。

1.3 数据分析

采用 SPSS 17.0 统计软件进行差异显著性分析、单因子方差分析结合多重比较分析。

2 结果与分析

2.1 玉米纹枯病菌对噻唑酰胺的敏感基线

菌丝生长速率法测定结果显示：供试 102 株玉米纹枯病菌对噻唑酰胺均具有较高的敏感性，其 EC₅₀ 值分布范围为 0.010~0.194 μg/mL，平均 EC₅₀ 值为 (0.086 ± 0.004) μg/mL，偏度 (skew) = 0.298，峰度 (kurt) = -0.298，*P* = 0.088 4 > 0.05，符合连续偏正态分布，且其敏感性频率分布呈连续单峰曲线 (图 1)。因此可将其作为山东地区玉米纹枯病菌对噻唑酰胺的敏感基线。

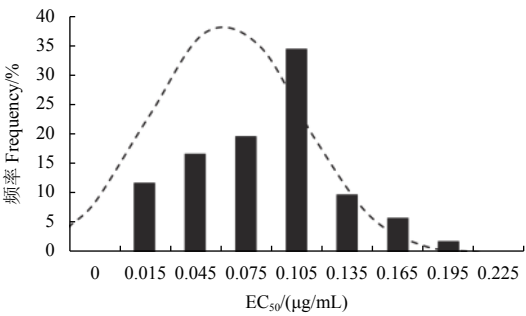


图 1 山东省 102 株玉米纹枯病菌对噻唑酰胺的敏感性频率分布

Fig. 1 Sensitivity distribution of 102 isolates of *R. solani* to thifluzamide

2.2 玉米纹枯病菌抗噻唑酰胺突变体

通过紫外诱导方法对随机选取的 12 个菌株进行抗药性选育，仅从菌株 TA3、TA17、LY8、QD14 及 WF6 获得了 5 株耐药性菌株，分别编号为 TA3-X2、TA17-X6、LY8-3、QD14-Y7 和 WF6-A2，其抗性突变频率为 0.87%，抗性水平为 6.46~20.08 倍。通过药剂驯化方法对 12 个菌株进行诱导后仅获得 1 株抗噻唑酰胺的突变体，编号为 QD2-Y4，突变频率为 0.52%，抗性水平为 8.08 倍 (表 1)。

表 1 抗性突变体及亲本菌株对噻呋酰胺的敏感性 & 抗性水平

Table 1 The sensitivity and resistance levels of resistant mutants and parental strains to thifluzamide

菌株 Isolate	EC ₅₀ /(μg/mL)	抗性水平 Resistance level, RL
TA3	0.073	—
TA3-X2	0.685	9.33
TA17	0.092	—
TA17-X6	0.591	6.46
LY8	0.043	—
LY8-3	0.867	20.08
QD14	0.115	—
QD14-Y7	1.383	11.99
WF6	0.075	—
WF6-A2	1.033	13.77
QD2	0.106	—
QD2-Y4	0.860	8.08

注: TA3、TA17、LY8、QD14、WF6 和 QD2 为亲本菌株, 其余为噻呋酰胺耐药性菌株和抗性突变体。
Note: TA3, TA17, LY8, QD14, WF6 and QD2 are parental isolates, the rest are drug-resistant isolates and resistant mutants to thifluzamide.

2.3 抗药性突变体的主要生物学性状

2.3.1 抗药性遗传稳定性 由表 2 可知: 抗性突变体及耐药性菌株在不含噻呋酰胺的 PDA 培养基上连续继代培养 12 代后, 除突变体 QD2-Y4 对噻呋酰胺的敏感性变化不大以外, 其余耐药性菌株敏感性均呈现明显的下降趋势, 且随培养代数增

加, 抗性突变体的 EC₅₀ 值越来越接近各自的亲本菌株 (F₀)。表明经紫外诱导获得的 5 株耐药性菌株其耐药性均不能稳定遗传, 而通过药剂驯化获得的突变体 QD2-Y4 菌株的抗药性可稳定遗传。

2.3.2 菌丝生长速率和产菌核能力 由表 3 可知: 在 24、36 及 48 h 培养期间, 除 TA3-X2 的菌落生长速率显著高于亲本菌株外, 其余耐药性菌株及抗性突变体与亲本菌株差异均不明显; 5 株耐药性菌株和 1 株抗性突变体的菌丝干重和菌核干重则均显著低于其亲本菌株。

2.3.3 致病力 结果见图 2。其中, 抗性突变体 TA3-X2、WF6-A2 和 QD2-Y4 的致病力显著低于各自亲本菌株, 病情指数分别下降 6.06、15.00 和 13.34; TA17-X6、LY8-3 和 QD14-Y7 的致病力虽与亲本菌株相比无显著性差异, 但整体却低于各自亲本菌株。

2.3.4 抗噻呋酰胺菌系的交互抗药性 由表 4 可知: 抗性突变体及亲本菌株对 8 种杀菌剂的敏感性由强到弱依次为咯菌腈 > 氟唑菌苯胺 > 戊唑醇 > 苯醚甲环唑 > 啉酰菌胺 > 丙环唑 > 井冈霉素 > 多菌灵。交互抗性测定结果 (表 5) 表明: 噻呋酰胺抗性突变体与戊唑醇、丙环唑、咯菌腈、井冈霉素、苯醚甲环唑及多菌灵 6 种杀菌剂之间无交互抗性关系, 但与氟唑菌苯胺和啉酰菌胺 2 种同属琥珀酸脱氢酶抑制剂类 (SDHIs) 的药剂之间则存在交互抗性。

表 2 玉米纹枯病菌抗噻呋酰胺突变体的抗性遗传稳定性

Table 2 Resistance stability of the mutants of *R. solani* to thifluzamide

菌株 Isolate	EC ₅₀ /(μg/mL)				
	F ₀	F ₃	F ₆	F ₉	F ₁₂
TA3	0.076 ± 0.004 a	0.076 ± 0.003 a	0.073 ± 0.001 a	0.073 ± 0.006 a	0.073 ± 0.002 a
TA3-X2	0.680 ± 0.004 a	0.523 ± 0.004 b	0.407 ± 0.002 c	0.163 ± 0.004 d	0.091 ± 0.003 e
TA17	0.093 ± 0.003 a	0.095 ± 0.002 a	0.091 ± 0.002 a	0.091 ± 0.006 a	0.093 ± 0.010 a
TA17-X6	0.588 ± 0.006 a	0.465 ± 0.009 b	0.294 ± 0.005 c	0.093 ± 0.007 d	0.087 ± 0.005 e
LY8	0.044 ± 0.002 a	0.041 ± 0.001 a	0.046 ± 0.005 a	0.037 ± 0.005 a	0.042 ± 0.003 a
LY8-3	0.863 ± 0.004 a	0.614 ± 0.005 b	0.526 ± 0.001 c	0.101 ± 0.007 d	0.052 ± 0.010 e
QD14	0.114 ± 0.001a	0.120 ± 0.002 a	0.114 ± 0.005 a	0.114 ± 0.003 a	0.111 ± 0.001 a
QD14-Y7	1.382 ± 0.002 a	1.122 ± 0.002 b	0.925 ± 0.003 c	0.628 ± 0.008 d	0.353 ± 0.004 e
WF6	0.075 ± 0.002 a	0.079 ± 0.002 a	0.076 ± 0.002 a	0.075 ± 0.006 a	0.078 ± 0.005 a
WF6-A2	1.034 ± 0.002 a	0.760 ± 0.001 b	0.395 ± 0.002 c	0.136 ± 0.005 d	0.087 ± 0.006 e
QD2	0.105 ± 0.003 a	0.106 ± 0.008 a	0.107 ± 0.002 a	0.106 ± 0.003 a	0.105 ± 0.003 a
QD2-Y4	0.862 ± 0.005 a	0.909 ± 0.001 a	0.839 ± 0.001 a	0.834 ± 0.003 a	0.858 ± 0.001 a

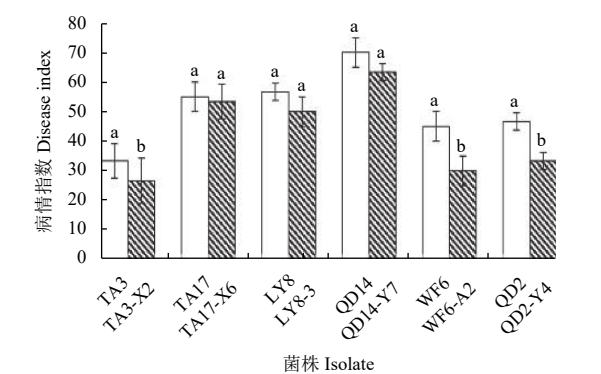
注: TA3、TA17、LY8、QD14、WF6 和 QD2 为亲本菌株, 其余为噻呋酰胺耐药性菌株和抗性突变体。同列数据后不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P = 0.05$ 水平差异显著。
Note: TA3, TA17, LY8, QD14, WF6 and QD2 are parental isolates, the rest are drug-resistant isolates and resistant mutants to thifluzamide. The different letters in the same column show significant difference at $P = 0.05$ level by Duncan's new multiple range tests.

表 3 抗性突变体与亲本菌株菌丝生长速率和产菌核能力比较

菌株 Isolate	菌落直径 Diameter of mycelia/cm			菌丝干重/(g/瓶) Dry weight of mycelium/(g/bottle)	菌核干重/(g/皿) Dry weight of sclerotium/(g/dish)
	24 h	36 h	48 h		
TA3	2.7 ± 0.03 b	4.3 ± 0.06 de	6.3 ± 0.09 d	1.36 ± 0.050 bc	0.138 7 ± 0.005 abc
TA3-X2	3.4 ± 0.03 a	4.8 ± 0.03 a	6.9 ± 0.10 b	1.05 ± 0.023 fg	0.095 7 ± 0.003 efg
TA17	2.5 ± 0.06 def	4.6 ± 0.03 abcd	6.8 ± 0.09 b	1.40 ± 0.029 bc	0.123 7 ± 0.012 bcd
TA17-X6	2.6 ± 0.06 cd	4.6 ± 0.05 abc	6.9 ± 0.06 b	1.21 ± 0.026 e	0.089 6 ± 0.011 fg
LY8	2.4 ± 0.03 g	4.2 ± 0.03 e	6.5 ± 0.06 cd	1.50 ± 0.029 a	0.115 8 ± 0.006 cde
LY8-3	2.6 ± 0.03 bc	4.4 ± 0.05 bcde	6.9 ± 0.06 b	1.24 ± 0.067 de	0.080 2 ± 0.007 g
QD14	2.5 ± 0.03 def	4.7 ± 0.09 ab	7.0 ± 0.16 b	1.44 ± 0.006 ab	0.146 8 ± 0.005 a
QD14-Y7	2.6 ± 0.03 cde	4.8 ± 0.03 a	7.0 ± 0.07 ab	1.14 ± 0.012 ef	0.104 9 ± 0.002 def
WF6	2.6 ± 0.03 cde	4.5 ± 0.03 abcd	6.6 ± 0.03 c	1.31 ± 0.015 cd	0.120 3 ± 0.013 bcd
WF6-A2	2.4 ± 0.03 fg	4.3 ± 0.03 cde	6.4 ± 0.03 cd	1.01 ± 0.039 g	0.074 9 ± 0.003 g
QD2	2.4 ± 0.03 g	4.7 ± 0.23 a	7.2 ± 0.07 a	1.33 ± 0.026 cd	0.141 8 ± 0.004 ab
QD2-Y4	2.5 ± 0.03 efg	4.6 ± 0.06 abc	6.9 ± 0.06 b	1.05 ± 0.012 fg	0.113 4 ± 0.006 de

注：TA3、TA17、LY8、QD14、WF6 和 QD2 为亲本菌株，其余为噻呋酰胺耐药性菌株和抗性突变体。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。

Note: TA3, TA17, LY8, QD14, WF6 and QD2 are parental isolates, the rest are drug-resistant isolates and resistant mutants to thifluzamide. The different letters in the same column show significant difference at $P=0.05$ level by Duncan's new multiple range tests.



注：TA3、TA17、LY8、QD14、WF6 和 QD2 为亲本菌株，其余为噻呋酰胺耐药性菌株和抗性突变体。图中不同字母表示亲本菌株及其突变体对玉米的致病力差异显著 ($P=0.05$)。

Note: TA3, TA17, LY8, QD14, WF6 and QD2 are parental isolates, the rest are drug-resistant isolates and resistant mutants to thifluzamide. The different letters in the figure indicate significant differences in pathogenicity of the parental isolates and its mutants to maize.

图 2 亲本菌株及抗性突变体对玉米的致病力
Fig. 2 The pathogenicity of parental isolates and resistant mutants on maize

3 结论与讨论

噻呋酰胺作为 SDHIs 杀菌剂^[17]，其机理为抑制琥珀酸脱氢酶的合成^[18]，从而阻碍病原菌线粒体上电子传递，抑制病原菌的生长^[19]。研究表明，噻呋酰胺对玉米纹枯病菌具有较高的抑制活性，可作为替代啉酰菌胺和井冈霉素防治纹枯病的药剂，且更为高效^[20]。本研究采用菌丝生长速

率法测定了山东省不同地区的 102 株玉米纹枯病菌对噻呋酰胺的敏感性，发现供试菌株对噻呋酰胺仍具有较高的敏感性，其 EC_{50} 值分布范围为 $0.010\sim0.194\text{ }\mu\text{g/mL}$ ，平均 EC_{50} 值为 $(0.086\pm0.004)\text{ }\mu\text{g/mL}$ ，且敏感性频率分布为连续单峰曲线，因此可将其作为山东地区玉米纹枯病菌对噻呋酰胺的敏感基线。

在杀菌剂抗性行动委员会 (FRAC) 列出的 55 种杀真菌药剂中，SDHIs 是生产并投放市场的新化合物中增长最快的一类药剂^[17]。该类杀菌剂已多次被报道具有抗性风险，如已检测到抗氟吡菌酰胺 (fluopyram) 的黄瓜白粉病菌^[21]，抗啉酰菌胺的马铃薯早疫病菌 *Alternaria solani* 和灰葡萄孢 *Botrytis cinerea*^[22-23]，以及抗萎锈灵 (carboxin) 的米曲霉 *Aspergillus oryzae* 等^[24]。噻呋酰胺作为 SDHIs 杀菌剂，虽然具有很高的生物活性，但由于其作用位点单一，因此抗药性风险较高^[25]。本研究通过紫外诱导和药剂驯化各获得 5 株耐药性菌株和 1 株抗性突变体，其中，通过紫外诱导获得的耐药性菌株其耐药性并不能稳定遗传，在继代培养中会逐渐丧失，而通过药剂驯化获得的 1 株抗性突变体在经过 12 代无药培养后仍具有较高的抗药性，因此认为该菌株抗性能够稳定遗传。此外，生物学特性研究发现，抗性突变体在

表 4 玉米纹枯病菌抗噻呋酰胺突变体及亲本对 8 种杀菌剂的敏感性

Table 4 Sensitivity of the thifluzamide-resistant mutants of *R. solani* and parental isolates to eight fungicides

菌株 Isolate	抑制中浓度 EC ₅₀ /(μg/mL)								
	噻呋酰胺 thifluzamide	戊唑醇 tebuconazole	丙环唑 propiconazole	咯菌腈 fludioxonil	井冈霉素 validamycin	苯醚甲环唑 difenoconazole	多菌灵 carbendazim	氟唑菌苯胺 penflufen	啮酰菌胺 boscalid
TA3	0.076 ± 0.004	0.116 ± 0.005	0.156 ± 0.001	0.031 ± 0.002	0.746 ± 0.047	0.124 ± 0.001	2.152 ± 0.007	0.044 ± 0.008	0.143 ± 0.003
TA3-X2	0.680 ± 0.004	0.107 ± 0.002	0.159 ± 0.004	0.034 ± 0.002	0.787 ± 0.096	0.127 ± 0.002	2.166 ± 0.002	0.427 ± 0.069	1.647 ± 0.053
TA17	0.093 ± 0.003	0.122 ± 0.002	0.163 ± 0.004	0.047 ± 0.001	0.861 ± 0.029	0.129 ± 0.008	2.260 ± 0.023	0.056 ± 0.002	0.158 ± 0.003
TA17-X6	0.588 ± 0.006	0.112 ± 0.002	0.155 ± 0.003	0.033 ± 0.001	0.812 ± 0.010	0.123 ± 0.002	2.297 ± 0.035	0.340 ± 0.011	0.956 ± 0.007
LY8	0.044 ± 0.002	0.092 ± 0.002	0.135 ± 0.001	0.027 ± 0.002	0.563 ± 0.025	0.105 ± 0.001	1.931 ± 0.052	0.025 ± 0.004	0.105 ± 0.008
LY8-3	0.863 ± 0.004	0.105 ± 0.003	0.134 ± 0.001	0.025 ± 0.004	0.535 ± 0.019	0.098 ± 0.006	1.921 ± 0.012	0.102 ± 0.002	0.558 ± 0.019
QD14	0.114 ± 0.001	0.135 ± 0.003	0.177 ± 0.003	0.049 ± 0.001	0.850 ± 0.028	0.139 ± 0.001	2.320 ± 0.007	0.063 ± 0.002	0.164 ± 0.006
QD14-Y7	1.382 ± 0.002	0.124 ± 0.004	0.169 ± 0.034	0.046 ± 0.002	0.800 ± 0.016	0.127 ± 0.004	2.264 ± 0.011	0.658 ± 0.027	1.602 ± 0.063
WF6	0.075 ± 0.002	0.113 ± 0.009	0.162 ± 0.006	0.035 ± 0.002	0.802 ± 0.009	0.124 ± 0.005	2.065 ± 0.021	0.043 ± 0.002	0.148 ± 0.007
WF6-A2	1.034 ± 0.002	0.113 ± 0.002	0.143 ± 0.002	0.031 ± 0.001	0.756 ± 0.004	0.125 ± 0.002	2.045 ± 0.041	0.481 ± 0.072	1.453 ± 0.012
QD2	0.105 ± 0.003	0.130 ± 0.003	0.167 ± 0.002	0.045 ± 0.004	0.858 ± 0.044	0.134 ± 0.004	2.325 ± 0.004	0.061 ± 0.001	0.161 ± 0.008
QD2-Y4	0.862 ± 0.005	0.115 ± 0.004	0.154 ± 0.003	0.047 ± 0.002	0.825 ± 0.006	0.138 ± 0.001	2.322 ± 0.010	0.464 ± 0.019	1.294 ± 0.057
Mean	0.493 ± 0.468	0.115 ± 0.012	0.156 ± 0.013	0.038 ± 0.009	0.767 ± 0.108	0.125 ± 0.012	2.172 ± 0.150	0.230 ± 0.230	0.699 ± 0.644

注: TA3、TA17、LY8、QD14、WF6 和 QD2 为亲本菌株, 其余为噻呋酰胺耐药性菌株和抗性突变体。

Note: TA3, TA17, LY8, QD14, WF6 and QD2 are parental isolates, the rest are drug-resistant isolates and resistant mutants to thifluzamide.

表 5 玉米纹枯病菌对噻呋酰胺及其他 8 种杀菌剂的交互抗性

Table 5 Cross-resistance between thifluzamide and the other eight fungicides in *R. solani*

药剂 Fungicide	回归方程 Regression equation	R ²	P
戊唑醇 tebuconazole	y = -0.001 7x + 0.116 2	0.005 0	0.821 7
丙环唑 propiconazole	y = -0.004 7x + 0.158 5	0.027 9	0.604 2
咯菌腈 fludioxonil	y = -0.000 2x + 0.037 6	0.000 1	0.974 6
井冈霉素 validamycin	y = -0.021 4x + 0.777 0	0.008 6	0.774 6
苯醚甲环唑 difenoconazole	y = -0.001 7x + 0.125 3	0.004 4	0.836 9
多菌灵 carbendazim	y = -0.001 7x + 2.173 2	0.000 0	0.986 7
氟唑菌苯胺 penflufen	y = 0.436 6x + 0.015 0	0.807 9	0.000 1
啮酰菌胺 boscalid	y = 1.221 3x + 0.097 0	0.787 2	0.000 1

注: x 为噻呋酰胺对抗性突变体及亲本菌株的 EC₅₀ 值, y 为其他药剂对抗性突变体及亲本菌株的 EC₅₀ 值。

Note: x is the EC₅₀ value of the thifluzamide to resistant mutants and parental isolates, and y is the EC₅₀ value of the other fungicide to resistant mutants and the parental isolates.

菌丝生长速率、菌丝干重、菌核干重以及致病力等方面与亲本菌株相当或低于亲本菌株, 表明抗性突变体竞争能力不如亲本菌株。交互抗性研究表明, 噻呋酰胺抗性突变体仅与同属 SDHIs 的氟唑菌苯胺和啮酰菌胺 2 种药剂之间存在交互抗性, 而与戊唑醇、丙环唑、咯菌腈、井冈霉素、苯醚甲环唑和多菌灵之间均无交互抗性, 因此推测玉米纹枯病菌对噻呋酰胺的抗药性风险为中等, 这与 Mu 等^[26]研究发现 *R. solani* 对噻呋酰胺产生抗性的风险是低到中等的结果一致。

孙海燕^[27]研究发现, 小麦纹枯病菌 *R. cerealis* 对噻呋酰胺的抗性与其琥珀酸脱氢酶上 *RCSdhB*、

RCSdhC 和 *RCSdhD* 基因的点突变相关, 而对本研究中能稳定遗传的抗药性菌株而言, 其抗性产生是否与上述 3 个亚基的点突变有关还有待进一步研究。

参考文献 (Reference):

[1] PASCUAL, TO DA, RAYMONDO, et al. Characterization by conventional techniques and PCR of *Rhizoctonia solani* isolates causing banded leaf sheath blight in maize[J]. *Plant Pathol*, 2000, 49(1): 108-118.

[2] 黄明波, 谭君, 杨俊品, 等. 玉米纹枯病研究进展[J]. *西南农业学报*, 2007, 20(2): 209-213.

HUANG M B, TAN J, YANG J P, et al. Research advance on banded leaf and sheath blight of maize[J]. *Southwest China J Agric Sci*, 2007,

20(2): 209-213.

[3] 吴大椿, 方守国, 余知和. 玉米纹枯病病原及生物学特性研究[J]. 湖北农学院学报, 1997, 17(1): 15-19.

WU D C, FANG S G, YU Z H. Studies on the pathogen and biological characteristics of maize sheath blight[J]. J Hubei Agric Coll, 1997, 17(1): 15-19.

[4] LI H R, WU B C, YAN S Q. Aetiology of *Rhizoctonia* in sheath blight of maize in Sichuan[J]. Plant Pathol, 2002, 47(1): 16-21.

[5] AKHTAR J, JHA K V, KUMAR A, et al. Occurrence of banded leaf and sheath blight of maize in Jharkhand with reference to diversity in *Rhizoctonia solani*[J]. Asian J Agric Sci, 2009, 1(2): 32-35.

[6] 徐建强, 平忠良, 党威, 等. 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[J]. 农药学报, 2017, 19(1): 25-31.

XU J Q, PING Z L, DANG W, et al. Sensitivity of *Rhizoctonia cerealis* to jinggangmycin and tolclofos-methyl in Henan Province in China[J]. Chin J Pestic Sci, 2017, 19(1): 25-31.

[7] SHUMATE R E, STARK C M, SCHEIBLE J J, et al. Process for marking *N*-alkylaminopolyhois: US5449770[P]. 1995-09-12.

[8] 仇是胜, 柏亚罗. 琥珀酸脱氢酶抑制剂类杀菌剂的研发进展(I)[J]. 现代农药, 2014, 13(6): 1-7.

QIU S S, BO Y L. Progress on research and development of succinate dehydrogenase inhibitor fungicides (I)[J]. Mod Agrochem, 2014, 13(6): 1-7.

[9] 冷鹏, 吴书宝, 徐升华, 等. 噻唑酰胺 240 克/升悬浮剂防治花生白绢病田间药效试验[J]. 农药科学与管理, 2012, 33(2): 51-53.

LENG P, WU S B, XU S H, et al. Field trails of thifluzamide 240 g/L SC on peanut sderotium rolfsii sacc[J]. Pestic Sci Administrat, 2012, 33(2): 51-53.

[10] 齐永志, 李海燕, 苏媛, 等. 小麦纹枯病菌对噻唑酰胺的敏感性及其抗性突变体的主要生物学性状[J]. 农药学报, 2014, 16(3): 271-280.

QI Y Z, LI H Y, SU Y, et al. Sensitivity to trifluzamide and main biological characteristics of resistant mutants of *Rhizoctonia cerealis*[J]. Chin J Pestic Sci, 2014, 16(3): 271-280.

[11] 王成凤. 小麦纹枯病菌 (*Rhizoctonia cerealis*) 对噻唑酰胺和咯菌腈的抗性风险评估[D]. 南京: 南京农业大学, 2014.

WANG C F. Resistance and risk assessment of *Rhizoctonia cerealis* to thifluzamide and fludioxonil[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2014.

[12] GEORGOPOULOS S G, DEKKER J. Detection and measurement of fungicide-resistance, general principles[J]. FAO Plant Prot Bull, 1982, 30(2): 39-42.

[13] 赵卫松, 韩秀英, 齐永志, 等. 辣椒疫霉对双炔酰菌胺的敏感性测定及其抗药突变体生物学性状研究[J]. 农药学报, 2011, 13(1): 21-27.

ZHAO W S, HAN X Y, QI Y Z, et al. Study on the sensitivity of *Phytophthora capsici* to mandipropamid and biological characteristics of resistant mutants[J]. Chin J Pestic Sci, 2011, 13(1): 21-27.

[14] BRUIN G C A, EDGINGTON L V. Induction of fungal resistance to metalaxyl by ultraviolet irradiation[J]. Phytopathology, 1982, 72(5): 476-480.

[15] 夏晓明. 禾谷丝核菌 (*Rhizoctonia cerealis*) 对戊唑醇的抗性机制研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2006.

XIA X M. Studies on the resistance mechanism of *Rhizoctonia cerealis* to tebuconazole[D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2006.

[16] 孔婷婷, 周晓锬, 高增贵, 等. 东北地区玉米纹枯病菌菌丝融合群鉴定及其致病力研究[J]. 玉米科学, 2013, 21(4): 132-137.

KONG T T, ZHOU X K, GAO Z G, et al. Identification of anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* on maize and the pathogenicities in Northeastern of China[J]. J Maize Sci, 2013, 21(4): 132-137.

[17] SIEROTZKI H, SCALLIET G. A review of current knowledge of resistance aspects for the next-generation succinate dehydrogenase inhibitor fungicides[J]. Phytopathology, 2013, 103(9): 880-887.

[18] 胡伟群, 宋会鸣, 朱卫刚, 等. 噻唑酰胺与咯菌腈复配对水稻纹枯病的增效作用及田间防效[J]. 农药, 2014, 53(9): 683-684.

HU W Q, SONG H M, ZHU W G, et al. Synergistic and field effects of thifluzamide and fludioxonil against *Rhizoctonia solani*[J]. Agrochemicals, 2014, 53(9): 683-684.

[19] HE L M, CUI K D, MA D C, et al. Activity, translocation, and persistence of isopyrazam for controlling cucumber powdery mildew[J]. Plant Dis, 2017, 101(7): 1139-1144.

[20] CHEN Y, ZHANG A F, WANG W X, et al. Baseline sensitivity and efficacy of thifluzamide in *Rhizoctonia solani*[J]. Ann Appl Biol, 2012, 161(3): 247-254.

[21] 李良孔. 黄瓜白粉病菌对氟吡菌酰胺敏感基线的建立及其抗性风险评估[D]. 长春: 吉林大学, 2011.

LI L K. Baseline sensitivity of *Podosphaera xanthii* to fluopyram and its resistance risk assessment[D]. Changchun: Jilin University, 2011.

[22] CHEN F, LIU X, CHEN S, et al. Characterization of *Monilinia fructicola* strains resistant to both propiconazole and boscalid[J]. Plant Dis, 2013, 97(5): 645-651.

[23] WHARTON P, FAIRCHILD K, BELCHER A, et al. First report of *in-vitro* boscalid-resistant isolates of *Alternaria solani* causing early blight of potato in Idaho[J]. Plant Dis, 2012, 96(3): 454.

[24] SHIMA Y, ITO Y, KANEKO S, et al. Identification of three mutant loci conferring carboxin-resistance and development of a novel transformation system in *Aspergillus oryzae*[J]. Fungal Genet Biol, 2009, 46(1): 67-76.

[25] AJAYI-OYETUNDE O O, BUTTS-WILMSMEYER C J, BRADLEY C A. Sensitivity of *Rhizoctonia solani* to succinate dehydrogenase inhibitor and demethylation inhibitor fungicides[J]. Plant Dis, 2017, 101(3): 487-495.

[26] MU W, WANG Z, BI Y, et al. Sensitivity determination and resistance risk assessment of *Rhizoctonia solani* to SDHI fungicide thifluzamide[J]. Ann Appl Biol, 2017, 170(2): 240-250.

[27] 孙海燕, 李伟, 邓渊钰, 等. 小麦纹枯病菌对噻唑酰胺抗性机制研究[C]//中国植物病理学会 2016 年学术年会论文集. 南京: 中国植物病理学会, 2016.

SUN H Y, LI W, DENG Y Y, et al. Study on the resistance mechanism of *Rhizoctonia solani*[C]//Proceedings of 2016 Annual Meeting of the Chinese Society for Plant Pathology. Nanjing: Chinese Society for Plant Pathology, 2016.

(责任编辑: 唐 静)