

马铃薯立枯丝核菌融合群的确定及其 对马铃薯侵染的观察

张明会,张雨竹,孙冬梅

(黑龙江八一农垦大学,黑龙江 大庆 163319)

摘要:为了研究不同地区马铃薯立枯丝核融合群的变化,对不同取样地的马铃薯立枯丝核菌进行了分离培养。通过番红 O-KOH 染色观察,确定分离获得的丝核菌菌株均为多核菌丝体。对获得的 35 株分离株与标准菌株进行对峙培养,利用菌丝融合试验判断其融合群,发现丝核菌菌株主要归属于 AG4 融合群;并在显微镜下观察到丝核菌菌丝对马铃薯的侵染。

关键词:立枯丝核菌;融合群;菌丝侵染

中图分类号:S435.32 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2016)03-0051-03 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2016.03.0051

丝核菌是常见的植物病原菌之一,它们在致病性、形态学、培养性状及生理特征等方面均有所不同^[1]。立枯丝核菌属半知菌亚门丝核菌属,拉丁学名为 *Rhizoctonia solani* Kühn。它是一种土传植物病原真菌,立枯丝核菌可侵染不同种植物^[2-3]。立枯丝核菌的感染可引起植物的烂种、根腐苗期猝倒和立枯病,引起禾谷类作物的纹枯病,而其在土壤中的腐生竞争力强,存活时间长,被认为是最具破坏力的土传植物病原菌之一^[4]。马铃薯的常见病害主要以病毒病、环腐病、青枯病等为主,随着种植时间与种植面积的增加,马铃薯菌核病、立枯丝核菌病等新型病害的患病几率逐年升高,尤其是感染、传播方式多样,寄主范围广泛的立枯丝核菌病更应引起重视。黑龙江省的马铃薯种植范围广,马铃薯种植环境适宜,是优质的马铃薯种植地区,也是我国马铃薯种植大省。而马铃薯病害的发生造成了许多地区产量低,品质差,严重制约了马铃薯产业的发展。马铃薯立枯丝核菌可引起马铃薯的黑痣病,对马铃薯的生长危害严重。马铃薯立枯丝核菌主要侵染马铃薯,也可侵染豌豆等植物,病变部位为幼芽、茎基部及块茎。本试验对来源不同的马铃薯立枯丝核菌融合群进行研究,以确定其遗传特性,为进一步防治该病提

供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

待测菌株由嫩江农场、赵光农场、北安农场感病马铃薯分离,即嫩江农场:嫩(1),嫩(2),嫩(3),嫩(4),嫩(5),嫩(6),嫩(7),嫩(8),嫩(9);赵光农场:北(1),北(2),北(3),北(4),北(5),齐(1),齐(2),齐(3),齐(4),讷(1),讷(2),讷(3);北安农场:克(1),克(2),克(3),克(4),克(5),克(6),克(7),克(8),克(9),丝核菌<一>,丝核菌<二>。标准菌株由沈阳农业大学惠赠,分别为 AG1-IB(R1),AG1-IC(R2),AG-1-2A(R3),AG2-2 III B(R4),AG2-1(R5),AG2-2 IV(R6),AG3(R7),AG4-HG1(R8),AG4-HG II(R9),AG6-HG I(R10),AG6-G V(R11),AG8 1512(R12),AG8W565(R13),AG9(R14),AG-BI(R15)。培养基选择马铃薯培养基(PDA),麦芽蛋白胨培养基(MPDA)与水琼脂培养基(1.5%琼脂加水)。

1.2 方法

试验于 2014 年在黑龙江八一农垦大学微生物技术实验室进行。

1.2.1 核相观察 培养皿内接入 1 株待测菌株(PDA培养基),每种菌株培养 3 皿(重复),在接种点周围培养基上斜插入 4~5 个盖玻片后,于 25℃恒温培养,待菌丝长至盖玻片的 1/2 处取出盖玻片,经番红 O-KOH 染色^[5]后,镜检其细胞核数目。

1.2.2 菌丝融合群的观察判别 采用载玻片定位融合法,并参考陈延熙等人改进的玻片配

收稿日期:2016-01-18

基金项目:“黑龙江农垦总局十二五”重点科技攻关资助项目(HNK11A-05-06)

第一作者简介:张明会(1991-),男,黑龙江省克东县人,在读硕士,从事微生物植物病害研究。E-mail:1109710173@qq.com。

通讯作者:孙冬梅(1970-),女,黑龙江省北安市人,博士,教授,从事植物病害生物防治研究。

对法^[6]。

1.2.3 丝核菌侵染马铃薯的观察 由于马铃薯的表皮组织较厚,丝核菌侵染马铃薯初期,马铃薯并没有明显病斑,需要对感病组织取病健交界处进行透明处理,经吉姆萨染液染色观察其侵染状态。

2 结果与分析

2.1 丝核菌的分离结果及核相观察

通过试验得知,对采集的不同地区的马铃薯立枯丝核菌病株用组织分离法进行分离,共得到立枯丝核菌菌株 35 株,分离培养后,经核相染色观察后发现,几乎所有丝核菌均为多核菌丝体(见图 1)。

2.2 融合群的判别结果

将 35 株分离株与标准菌株进行菌丝融合试验,试验中出现 3 种现象(见图 2):①融合,即接触细胞间细胞壁溶解,细胞内细胞质融合,细胞核流入另一菌丝内,属同一融合群。完全融合分为:

顶端对顶端的融合(见图 2A);顶端对侧枝的融合(见图 2B);侧枝对侧枝的融合(见图 2C)。②不融合,即接触细胞壁不溶解,接触细胞无异常反应,各自菌丝按原来方向继续生长,不发生细胞融合,属于不同融合群^[7](见图 2D)。③自融:同一丝核菌在生长过程中会产生自融现象,即同种丝核菌菌丝间互相融合,试验观察中要注意辨别自融现象,避免混淆(见图 2E)。

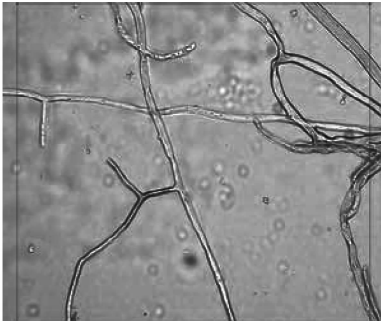


图 1 丝核菌的核相(400 倍)

Fig. 1 *Rhizoctonia solani* Kühn's nucleus observing

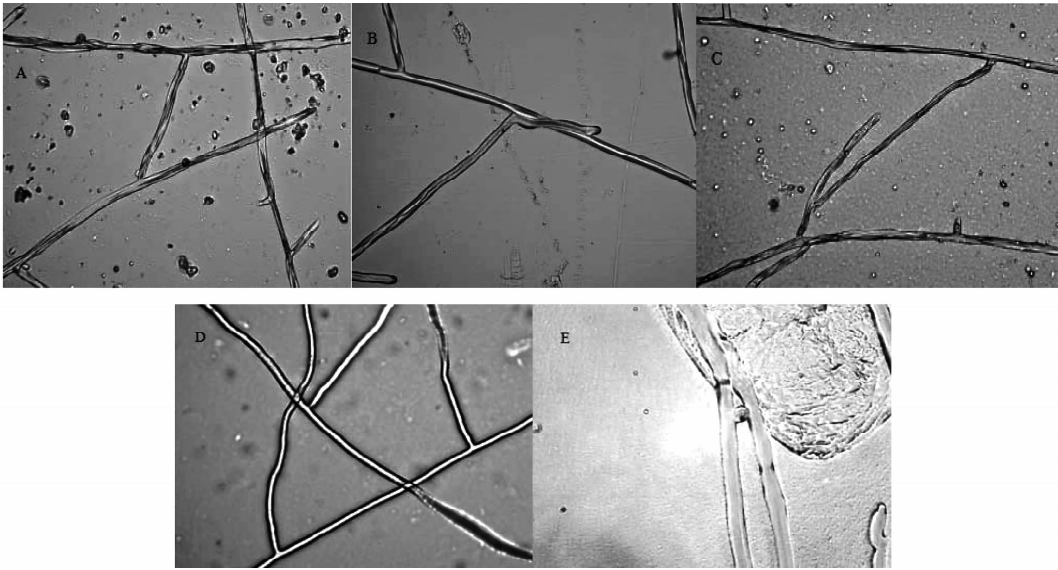


图 2 菌丝融合现象

Fig. 2 Hyphaeanastomosis phenomenon

利用上述现象,对不同菌株测试后得到的试验数据见表 1。融合的菌和不完全融合的菌是同一融合群,而不融合的菌不是同一融合群。通过对照标准菌株(已知其融合群)与待测菌株的融合来找出待测菌株的融合群。试验结果证实,从各地分离到的马铃薯立枯丝核菌融合群以 AG4(R8、R9)为主,但同一菌株可分属于不同融合群,如马铃薯立枯丝核菌<一>立枯丝核和 AG1-IB(R1)、AG4-HG1(R8)、AG4-HG II(R9)

为同一融合群。马铃薯立枯丝核菌<二>和 AG1-IB(R1)、AG4(R8、R9)为同一融合群。而来源于克山、嫩江、北安、齐齐哈尔等不同地区的立枯丝核菌分属于 AG1(R1、R2、R3)、AG3(R7)和 AG4(R8、R9)融合群。

2.3 丝核菌侵染马铃薯的观察

经吉姆萨染液染色,观察到丝核菌主要侵染部位为马铃薯的表皮层(见图 3)。

表 1 待测菌株融合群判别

Table 1 *Rhizoctonia solani* Kühn anastomosis groups depending

待测丝核菌菌株	标准菌株 Standard strains														
Strains under test	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	R12	R13	R14	R15
丝核菌<一>	Y	N	N	N	N	N	N	N	Y	N	N	Y	N	N	-
丝核菌<二>	-	N	N	Y	-	N	N	N	N	Y	-	N	-	N	N
克(1)	N	Y	N	Y	N	-	Y	N	N	N	N	Y	N	N	N
克(2)	Y	N	-	N	N	-	Y	N	N	N	N	N	-	N	N
克(3)	N	Y	N	Y	N	-	Y	-	N	N	N	-	-	N	N
克(4)	N	Y	N	N	N	N	Y	N	N	N	N	N	-	N	N
克(5)	N	Y	N	Y	N	-	Y	N	N	N	N	-	N	N	N
克(6)	N	Y	N	Y	N	N	Y	N	-	N	N	N	N	N	N
克(7)	N	Y	N	Y	N	-	Y	-	N	N	N	N	N	N	N
克(8)	N	Y	N	Y	N	-	N	N	N	N	N	N	-	N	N
克(9)	N	Y	N	Y	N	N	N	N	N	N	N	-	N	N	N
嫩(1)	N	Y	N	Y	N	N	N	N	N	N	N	-	N	N	N
嫩(2)	N	Y	N	Y	N	N	N	N	N	N	N	-	N	N	N
嫩(3)	N	Y	N	Y	N	N	N	N	N	N	N	N	-	N	N
嫩(4)	N	Y	N	Y	N	N	N	N	N	N	N	N	-	N	N
嫩(5)	N	Y	N	Y	N	N	N	N	N	N	N	N	-	N	N
嫩(6)	N	Y	N	Y	N	N	N	N	N	N	N	-	N	N	N
嫩(7)	N	Y	N	Y	N	N	N	N	N	N	N	-	N	N	N
嫩(8)	N	Y	N	Y	N	N	N	N	N	N	N	-	N	N	N
嫩(9)	N	Y	N	Y	N	N	N	N	N	N	N	-	N	N	N
北(1)	N	Y	N	Y	N	N	N	N	N	N	N	N	-	N	N
北(2)	N	Y	N	Y	N	-	Y	N	N	N	N	-	N	N	N
北(3)	N	Y	N	Y	N	N	Y	N	N	N	N	-	N	N	N
北(4)	N	Y	N	Y	N	-	Y	N	N	N	N	-	-	N	N
北(5)	N	Y	N	Y	N	-	Y	-	N	N	N	N	N	N	N
齐(1)	N	Y	N	Y	N	N	Y	N	N	N	N	N	-	N	N
齐(2)	N	Y	N	Y	N	N	Y	N	N	N	N	N	N	N	N
齐(3)	N	Y	N	Y	N	N	Y	-	N	N	N	-	N	N	N
齐(4)	N	Y	N	Y	N	-	Y	N	N	N	N	N	N	N	N
讷(1)	N	Y	N	Y	N	N	Y	N	N	N	N	-	-	N	N
讷(2)	N	Y	N	Y	N	N	Y	-	N	N	N	N	N	N	N
讷(3)	N	Y	N	Y	N	-	Y	-	N	N	N	N	-	N	N

Y 表示融合的菌,N 表示不融合的菌,- 表示不完全融合的菌。
Y shows fusion strain,N shows not fusion,- shows incomplete fusion.

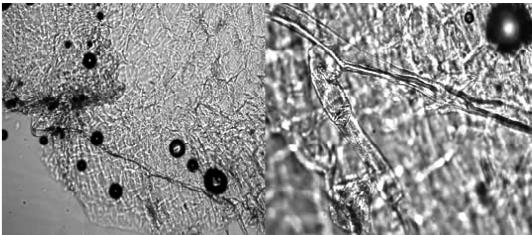


图 3 丝核菌侵染马铃薯表皮

Fig.3 Potato epidermal infected by *Rhizoctonia solani* Kühn

3 结论与讨论

试验发现,采集的感病植株有的可分离到丝核菌,有的分离到的为镰刀菌,即镰刀菌引致的根

部病斑有时与黑痣病斑很难区分;共分离到 35 株丝核菌菌株,经融合群鉴定,嫩江、赵光、北安等地的马铃薯丝核菌多为多核丝核菌,多数属于 AG4 融合群,同时也发现了 AG3 和 AG1 融合群的菌株,并观察到同一菌株属于不同融合群的现象。而内蒙古地区马铃薯丝核菌主要归属于 AG3 融合群^[8],这说明了马铃薯立枯丝核菌融合群的复杂性,试验结果同样证实了对丝核菌病害的有效防治尚存在一定的困难^[4]。丝核菌主要侵染马铃薯表皮部分,在细胞之间穿插而并不进入细胞内,破坏局部组织,影响营养供应,导致马铃薯病变。