

# 广州地区 13 种作物丝核菌的鉴定

黄江华, 周而勋, 戚佩坤

(华南农业大学 植物病理学系, 广东 广州 510642)

摘要: 从广州地区 13 种作物上分离得到 57 个丝核菌(*Rhizoctonia* spp.) 菌株. 依菌丝直径、细胞核数目和培养性状等鉴定出 52 个立枯丝核菌(*R. solani*)、2 个水稻丝核菌(*R. oryzae*) 和 3 个双核丝核菌(binucleate *Rhizoctonia*); 并对 52 个立枯丝核菌(*R. solani*) 菌株进行了融合群归类, 其中有 30 个菌株属于 AG-1-IA、1 个属于 AG-1-IB、4 个属于 AG-1-IC、12 个菌株属于 AG-4、3 个菌株属于 AG-2-2 III B、2 个菌株未知其归属.

关键词: 丝核菌; 立枯丝核菌; 菌丝融合群

中图分类号: S432.4; Q949.32

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2003)04-0024-04

丝核菌(*Rhizoctonia* spp.) 是一类在自然界中广泛存在的真菌, 有许多植物病害是由此属真菌引起的<sup>[1]</sup>. 丝核菌根据细胞核数目的多少, 可分为单核丝核菌(uninucleate *Rhizoctonia*)<sup>[2]</sup>、双核丝核菌(binucleate *Rhizoctonia*) 和多核丝核菌(multinucleate *Rhizoctonia*)<sup>[3]</sup>, 其中在生产上具有重要意义的立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*) 属于多核丝核菌. 不同丝核菌对不同作物有着完全不同的致病性, 弄清广州地区丝核菌菌群的分布, 对指导如何防治此类病害具有重要的意义.

## 1 材料与方法

### 1.1 标本的采集及丝核菌的分离

从广州市的增城、花都、番禺和从化市(区)以及广州市蔬菜科学研究所、广州市园林研究所、华南农业大学农场等地的玉米(*Zea mays*)、甜玉米(*Zea mays* var. *saccharata*)、生菜(*Lactuca sativa*)、黄瓜(*Cucumis sativus*)、海桐(*Pittosporum tobira*)、红苋菜(*Amaranthus gangeticus*)、香蕉(*Musa nana*)、绣球(*Hydrangea macrophylla*)、瑞香(*Daphne odora*)、长豇豆(*Vigna sesquipedalis*)、茴香(*Foeniculum vulgare*)、康乃馨(*Dianthus caryophyllus*) 和甘蓝(*Brassica capitata*) 共 13 种作物上采集表现纹枯病或立枯病症状的新鲜病害标本, 按周而勋等<sup>[4]</sup>报道的方法分离获得纯培养的丝核菌<sup>[3,5]</sup> 菌株, 保存备用. 本研究所用的培养基为马铃薯葡萄糖琼脂(PDA) 和水琼脂(WA) 培养基<sup>[6]</sup>.

### 1.2 丝核菌培养性状的观察

各待测菌株先用直径 6 cm 的培养皿培养 2 皿, 2

d 后, 用打孔器在培养皿菌落边缘处切取直径为 5 mm 的菌丝块, 移入 PDA 平板(直径 9 cm) 中央, 25 °C 下培养, 每菌株 3 次重复, 隔 12 h 观察 1 次菌落的生长情况, 并在显微镜下观察菌丝的特征<sup>[3,5]</sup>.

### 1.3 丝核菌菌丝直径的测量

丝核菌在 PDA 平板上, 25 °C 条件下, 培养 5~7 d, 用镊子或解剖针在菌落边缘(菌丝生长旺盛处)挑一小块菌丝, 放在载玻片上, 滴上乳酚油(或清水), 在 Olympus BH2 显微镜 40 倍下测量菌丝直径, 每菌株随机测量 10 处.

### 1.4 丝核菌细胞核的染色

1.4.1 各种染色液的配制 (1) 番红 O-KOH 染色液的配制: 按照 Bandoni<sup>[7]</sup> 报道的方法配制番红 O-KOH 染色液, 装于棕色瓶中备用. (2) Giemsa 染色液的配制: 量取甘油 33 mL, 在研钵中加入 0.5 g Giemsa 粉, 先用少量甘油和 Giemsa 粉混合, 研磨至无颗粒为止, 然后将剩余甘油倒入, 56 °C 保持 2 h 后, 再加入 33 mL 甲醇, 即为 Giemsa 母液, 装于棕色瓶中备用(4 °C 冰箱保存); 将 61.0 mL 0.2 mol/L 的 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 与 39.0 mL 0.2 mol/L 的 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 相混合, 即为 0.2 mol/L 磷酸缓冲溶液(pH 7.0); 由 2 份(体积)0.2 mol/L 磷酸缓冲液与 1 份(体积)Giemsa 母液混合, 即为 Giemsa 染色液(现配现用). (3) 苯胺蓝-甘油的配制: 按照 Tu<sup>[8]</sup> 的方法配制苯胺蓝-甘油染色液, 装于棕色瓶中备用. (4) 苯胺蓝-乳酚油和曲利苯蓝-乳酚油染色液的配制: 用乳酚油<sup>[9]</sup> 作溶剂, 配制 5.0 g/L 的苯胺蓝和曲利苯蓝溶液, 即为苯胺蓝-乳酚油和曲利苯蓝-乳酚油染色液.

1.4.2 染色方法与步骤 在直径 9 cm 的培养皿内培

收稿日期: 2003-04-18 作者简介: 黄江华(1973-), 男, 讲师, 硕士, 现在仲恺农业技术学院植保系工作. 通讯作者: 周而勋(1963-), 男, 副教授, 博士.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39870438); 广东省自然科学基金资助项目(950383)

©1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

养2个已鉴定过的立枯丝核菌菌株,每个菌株培养5皿(重复),在培养基上插上盖玻片(每皿插5片),让菌丝直接长在盖玻片上.在25℃下培养2~3d,待菌丝长至盖玻片的1/3处时,取出盖玻片,滴上染色液,对每种染色液,按染色时间1、3、5、……min分别盖片观察,并拍照<sup>[9]</sup>.

用番红O-KOH、Giemsa、苯胺蓝-甘油、苯胺蓝-乳酚油和曲利苯蓝-乳酚油5种染色液对已鉴定过的立枯丝核菌菌丝进行染色,比较效果,拍照,从中筛选出一种简便、快速的方法,对所有待测菌株进行染色,确定其细胞核数目.

每个待测菌株培养3皿(直径9cm),培养方法同上.用筛选出的快速、简便的方法进行染色,将结果拍照.每个盖玻片观察10个菌丝细胞的细胞核数目,记录其变幅范围.

### 1.5 立枯丝核菌菌丝融合群的测定

对待测菌株中被鉴定为立枯丝核菌的菌株进行菌丝融合群鉴定.

培养待测菌株及标准融合群(anastomosis group, AG)菌株,各2皿,25℃培养2d后,用打孔器切取直径5mm的菌丝块,备用.

于超净工作台内,将灭菌载玻片置于融化的水琼脂(20g/L)中浸后取出,平移入培养皿,水琼脂成一层凝固在载玻片上.挑取标准AG菌株的菌丝块于载玻片正中,两侧间隔约1.5~2.0cm处分别置同一待测菌株的菌丝块,把接菌后的载玻片放入保湿的培养皿中(注入2~4mL灭菌水),25℃下培养.每菌株做3片载玻片,共6个重复.当待测菌株与标准AG菌株的菌落前缘在载玻片上相遇并交叠2~3mm后(12~24h),取出载玻片,镜检其菌丝的融合情况.完全融合(+):菌丝接触后细胞壁溶解,原生质融合;不完全融合(±):菌丝接触,细胞壁溶解后紧接着的是细胞死亡;不融合(-):两菌丝互不干扰对方生长,交叉而过.

## 2 结果与分析

### 2.1 菌丝直径测量结果

测量结果表明:海桐01、绣球01和长豇豆01三个菌株的菌丝直径在4~7μm范围内,而其余菌株菌丝直径均在6~10μm范围内.

### 2.2 各种染色方法的染色效果及应用

对番红O-KOH、Giemsa、苯胺蓝-甘油、苯胺蓝-乳酚油和曲利苯蓝-乳酚油5种染色液的染色效果比较发现:番红O-KOH染色液的染色速度快、细胞核及背景都非常清晰,易于拍照,是5种染色液中效果最好的.用该染色液对全部57个待测丝核菌(*Rhizo-*

*tonia* spp.)菌株进行染色,在显微镜下数出各菌株的细胞核数目,结果见表1.

### 2.3 丝核菌的鉴定结果

本研究通过菌丝直径测量、菌丝细胞核染色和培养性状的观察,并结合丝核菌的其他特征<sup>[3,9]</sup>,对所有待测的57个菌株进行了鉴定,其中属于多核丝核菌的菌株有54个;属于双核丝核菌的菌株有3个,即海桐01、绣球01和长豇豆01菌株.在54个多核丝核菌菌株中,甜玉米上的12号和13号菌株在PDA上的纯培养菌落呈橙红色,菌核小也呈橙红色,被鉴定为水稻丝核菌(*R. oryzae*)<sup>[10,11]</sup>;其余52个多核丝核菌菌株被鉴定为立枯丝核菌(*R. solani*).

### 2.4 立枯丝核菌菌丝融合群测定结果

对52个立枯丝核菌(*R. solani*)菌株进行了融合群测定,结果如下:

属于AG-1-IA的有30个菌株,即玉米01、玉米02、甜玉米03、甜玉米05、甜玉米06、甜玉米07、甜玉米08、甜玉米09、甜玉米10、甜玉米11、甜玉米16、甜玉米17、甜玉米18、甜玉米19、甜玉米20、甜玉米21、甜玉米24、甜玉米25、甜玉米26、甜玉米27、甜玉米28、甜玉米29、甜玉米30、甜玉米31、甜玉米32、甜玉米33、甜玉米35、甜玉米36、甜玉米38和甜玉米39.

属于AG-1-IB的有1个菌株,即甜玉米15.

属于AG-1-IC的有4个菌株,即甜玉米04、甜玉米14、甜玉米23、甜玉米37.

属于AG-2-2 IIB的有3个菌株,即香蕉01、甘蓝02和甘蓝04.

属于AG-4的有12个菌株,即生菜01、黄瓜01、黄瓜02、黄瓜03、黄瓜04、红苋菜01、茴香01、茴香02、茴香03、甘蓝01、甘蓝03、康乃馨01.

尚不能确定其归属的菌株有2个,即瑞香01和茴香04.但瑞香01与AG-2-1、AG-2-2 IIB、AG-2-2-IV均可融,而茴香04与AG-1-IA、AG-1-IB、AG-1-IC、AG-2-1、AG-2-2 IIB、AG-2-2-IV和AG-4均不融合.

## 3 结论与讨论

从广州地区13种作物上分离到的57个菌株全部被鉴定为丝核菌(*Rhizoctonia* spp.),其中有3个为双核丝核菌(binucleate *Rhizoctonia*),其余54个为多核丝核菌(multinucleate *Rhizoctonia*).在54个多核丝核菌菌株中,2个为水稻丝核菌(*R. oryzae*),52个为立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*).通过菌丝融合群测定,在52个立枯丝核菌中,有30个属于AG-1-IA,1个属于AG-1-IB,4个属于AG-1-IC,12个属于AG-4,3个属于AG-2-2 IIB,2个未知其归属.优势菌丝融合群为AG-1-IA.

表1 13种作物丝核菌菌株细胞核染色结果

Tab. 1 Nuclear staining results of *Rhizoctonia* spp. isolated from 13 crops

(n = 10)

菌株编号 isolate code	细胞核数目 number of nucleus		菌株编号 isolate code	细胞核数目 number of nucleus	
	范围 range	$\bar{x} \pm SE$		范围 range	$\bar{x} \pm SE$
玉米 01 corn01	9~16	12.5±0.734 1	甜玉米 31 sweet com31	4~8	5.8±0.442 2
玉米 02 corn02	6~10	8.6±0.371 2	甜玉米 32 sweet com32	5~10	6.4±0.541 6
甜玉米 03 sweet corn03	7~11	8.8±0.359 0	甜玉米 33 sweet com33	6~9	7.1±0.378 6
甜玉米 04 sweet corn04	6~10	8.0±0.333 3	甜玉米 35 sweet com35	5~8	6.4±0.339 9
甜玉米 05 sweet corn05	10~15	12.5±0.582 1	甜玉米 36 sweet com36	5~10	7.6±0.426 9
甜玉米 06 sweet corn06	7~11	9.1±0.481 9	甜玉米 37 sweet com37	6~12	9.0±0.596 3
甜玉米 07 sweet corn07	8~16	11.7±0.830 7	甜玉米 38 sweet com38	5~8	6.9±0.276 9
甜玉米 08 sweet corn08	9~14	10.7±0.495 5	甜玉米 39 sweet com39	4~8	6.1±0.481 9
甜玉米 09 sweet corn09	6~9	7.5±0.341 6	生菜 01 lettuce01	6~10	7.7±0.395 8
甜玉米 10 sweet corn10	10~19	14.7±0.931 5	黄瓜 01 cucumber01	5~8	6.2±0.388 7
甜玉米 11 sweet corn11	5~7	6.3±0.213 4	黄瓜 02 cucumber02	6~8	6.5±0.223 6
甜玉米 12 sweet corn12	6~12	8.8±0.533 3	黄瓜 03 cucumber03	5~8	6.4±0.266 7
甜玉米 13 sweet corn13	9~11	10.0±0.258 2	黄瓜 04 cucumber04	5~11	6.5±0.562 7
甜玉米 14 sweet corn14	6~11	9.4±0.452 2	香蕉 01 banana01	6~10	8.1±0.504 4
甜玉米 15 sweet corn15	6~10	7.3±0.366 7	绣球 01 hydrangea01	2	2.0±0.000 0
甜玉米 16 sweet corn16	7~13	10.3±0.597 2	瑞香 01 daphne01	7~9	8.0±0.333 3
甜玉米 17 sweet corn17	6~10	7.7±0.423 0	长豇豆 01 yard long-bean 01	2~3	2.4±0.163 3
甜玉米 18 sweet corn18	6~8	6.8±0.290 6	海桐 01 mock orange01	2	2.0±0.000 0
甜玉米 19 sweet corn19	5~8	5.9±0.314 5	红苋菜 01 amaranth01	6~10	7.0±0.447 2
甜玉米 20 sweet corn20	5~9	6.9±0.348 0	茴香 01 fennel01	5~8	6.6±0.400 0
甜玉米 21 sweet corn21	5~9	7.2±0.388 7	茴香 02 fennel02	7~10	8.0±0.333 3
甜玉米 23 sweet corn23	4~8	6.0±0.447 2	茴香 03 fennel03	3~5	4.2±0.290 6
甜玉米 24 sweet corn24	5~8	6.7±0.423 0	茴香 04 fennel04	4~8	5.2±0.442 2
甜玉米 25 sweet corn25	7~9	7.7±0.213 4	甘蓝 01 cabbage01	5~7	5.8±0.290 6
甜玉米 26 sweet corn26	5~7	6.3±0.213 4	甘蓝 02 cabbage02	6~14	7.7±0.803 5
甜玉米 27 sweet corn27	5~8	6.6±0.305 5	甘蓝 03 cabbage03	4~8	5.4±0.498 9
甜玉米 28 sweet corn28	5~7	6.3±0.213 4	甘蓝 04 cabbage04	5~8	6.4±0.400 0
甜玉米 29 sweet corn29	7~9	7.4±0.221 1	康乃馨 01 camation01	6~9	7.1±0.314 5
甜玉米 30 sweet corn30	5~7	5.9±0.276 9			

立枯丝核菌(*R. solani*)各融合群的寄主植物虽广泛而复杂,但仍表现出一定的专化性.据陈延熙等<sup>[12]</sup>的研究,AG-1-IA包括不同地区分离到的水稻、玉米、粟和甘蔗等禾本科作物的纹枯病菌以及大豆叶斑病菌;AG-1-IB则只有类似纹枯病症状的鹅观草和狗尾草上得到的分离株;AG-2主要是十字花科蔬菜或冬作物丝核菌分离物;AG-3是马铃薯茎基腐病原菌;AG-4寄主来源比较广,能引起几乎所有被子植物的种子和下胚轴腐烂,部分作物茎基和根冠腐烂以及气生部分枯萎等病害;AG-5是一类自土壤分离得到的腐生性最强的丝核菌<sup>[5,13]</sup>.AG-6是从不被认为是植物病原菌或仅有极其微弱的致病性的,但在近几年的研究中发现,AG-6不仅仅只是作为腐生菌而存在,在一些寄主(如苹果)上是具有极强的致病

力的<sup>[14]</sup>.

玉米及甜玉米上35个菌株全归入AG-1,其中,30个归入AG-1-IA,1个归入AG-1-IB,4个归入AG-1-IC,大体符合上述规律.但不同于前人的是,甜玉米15是从甜玉米上分离得到的,却归入AG-1-IB. AG-4群确实有着广泛的寄主范围,本研究待测菌株中属AG-4群的菌株来自生菜、黄瓜、红苋菜、茴香、甘蓝、康乃馨6种作物,这与陈延熙<sup>[12]</sup>、李华荣<sup>[14]</sup>所述的一致,反过来也进一步证明了AG-4的寄主范围广,为害大.

香蕉01、甘蓝02和甘蓝04三个菌株与AG-2-2 IIB融合,它们的寄主为香蕉、甘蓝,这与李华荣<sup>[10]</sup>所陈述的AG-2-2 IIB侵染水稻引起褐色鞘枯病不同,看来AG-2-2 IIB不仅仅是引起水稻褐色鞘枯病,

也可引起果树、蔬菜甚至花卉幼苗的立枯病。

另据研究报道,十字花科植物上的立枯丝核菌主要是 AG-2-1 类群<sup>[12, 13]</sup>,而本研究从甘蓝、生菜等十字花科作物上分离到的立枯丝核菌多数属于 AG-4,而无一属于 AG-2-1,这可能是由于不同地区病菌类群分布存在差异所致。

从田间分离到双核及多核类丝核菌:甘蓝 01 和甘蓝 02 是从同一田块采集到的,分属于 AG-4 和 AG-2-2-III B;田间甚至同一块田存在着不同的丝核菌以及立枯丝核菌内不同的菌丝融合群菌株,反映了丝核菌分布的多样性、丰富性以及融合群间关系的复杂性。这与目前尚无水稻纹枯病的优良抗性品种是否有关尚不清楚,也许对这个问题的深入研究,会有利于生产上更好地防治丝核菌病害。

#### 参考文献:

- [1] 王洪凯,刘开启,吴洵耻. 丝核菌分类研究进展 [J]. 山东农业大学学报, 1997, 28 (3): 375-381.
- [2] HIETALA A M, SEN R B, LILJA A. Anamorphic and teleomorphic characteristics of a uninucleate *Rhizoctonia* sp. isolated from the roots of nursery grown conifer seedlings [J]. Mycological Research, 1994, 98 (9): 1044-1050.
- [3] SNEH B, BURPEE L, OGOSHI A. Identification of *Rhizoctonia* species [M]. St Paul: APS Press, 1991. 31-43.
- [4] 周而勋,杨媚. 从植物病组织中分离丝核菌的快速、

- 简便技术 [J]. 华南农业大学学报, 1998, 19 (1): 125-126.
- [5] 北京农业大学植保系植物生态病理教研室. 植物根际生态学与根病生物防治进展 [M]. 北京: 中国人民大学出版社, 1991. 499.
- [6] 方中达. 植病研究方法 [M]. 第3版. 北京: 中国农业出版社, 1998. 46-47, 113-114.
- [7] BANDONI R J. Safranin O as a rapid nuclear stain for fungi [J]. Mycologia, 1979, 71: 873-874.
- [8] TU C C, KIMBROUGH J W. A rapid staining technique for *Rhizoctonia solani* and related fungi [J]. Mycologia, 1973, 65: 941-944.
- [9] 黄江华,杨媚,周而勋,等. 丝核菌细胞核染色技术的研究 [J]. 仲恺农业技术学院学报, 2001, 14 (4): 13-17.
- [10] VOORHES R K. Sclerotial rot of corn caused by *Rhizoctonia zeae* n sp [J]. Phytopathology, 1934, 24: 1290-1303.
- [11] RYKER T C, GOOCH F S. *Rhizoctonia* sheath spot of rice [J]. Phytopathology, 1938, 28: 233-246.
- [12] 陈延熙,张敦华,段霞渝,等. 关于 *Rhizoctonia solani* 菌丝融合分类和有性世代的研究 [J]. 植物病理学报, 1985, 15 (8): 139-143.
- [13] 李华荣. 丝核菌 (*Rhizoctonia*) 属真菌的分类学进展 [J]. 国外农学-植物保护, 1988 (4): 9-14.
- [14] 李华荣. 丝核菌的菌丝融合群及其遗传多样性研究的新进展 [J]. 菌物系统, 1999, 18 (1): 100-107.

## Identification of *Rhizoctonia* spp.

### Isolated from Thirteen Crops in Guangzhou Region in China

HUANG Jiang-hua, ZHOU Er-xun, QI Pei-kun

(Department of Plant Pathology, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** Fifty-seven isolates of *Rhizoctonia* spp. were isolated from diseased tissues of sheath blight or damping-off in thirteen crop plants in Guangzhou region, China. According to mycelial diameters, nuclear numbers and culture characters, the isolates were categorized as follows: fifty-two isolates were identified as *R. solani*, two isolates as *R. oryzae* and the other three isolates as binucleate *Rhizoctonia*. According to the test of anastomosis groups (AGs), fifty-two of *R. solani* were categorized as follows: thirty isolates were grouped into AG-1-IA, one into AG-1-IB, four into AG-1-IC, twelve into AG-4, three into AG-2-2 III B, and two unknown.

**Key words:** *Rhizoctonia* spp.; *Rhizoctonia solani*; anastomosis groups

【责任编辑 周志红】