

不同地区小麦纹枯病菌的生物学特性及种类鉴定研究

陈健华^{1,2}, 邢锦城^{1,3}, 张茸茸², 张旭^{1*}, 陈怀谷¹, 马鸿翔¹

(1. 江苏省农业科学院 华东作物遗传改良与育种农业部重点实验室/江苏省农业生物学重点实验室, 江苏 南京 210014; 2. 江西农业大学 农学院, 江西 南昌 330045; 3. 南京农业大学 农学院, 江苏 南京 210097)

摘要:为明确江苏、安徽、河南等省小麦纹枯病菌的种类及生物学特性,2008年从江苏省扬州市、高邮市、仪征市、安徽省六安市及河南省临颖县、温县采集并分离纯化得到30株小麦纹枯病原菌,从中选择6个代表性病原菌进行了生物学特性及种类鉴定研究。结果表明:所有病原菌在pH在4~9内均可以生长,以pH为5时生长速度最快;生长温度为20~25℃,其中以22.5℃最适;在不同培养基上的生长速度由大到小依次为:PSA培养基、PDA培养基、改良PDA培养基、查彼培养基、玉米粉培养基。高邮纹枯病菌生长最快,菌丝较粗;扬州、仪征、临颖和温县纹枯病菌生长相对较慢,菌丝较细、稀疏;六安纹枯病菌生长最慢,菌丝较粗、稍密。番红O-KOH染色结果表明,扬州、仪征、临颖和温县纹枯病菌为双核丝核菌,高邮和六安纹枯病菌为多核丝核菌。丝核菌专化性PCR检测结果表明扬州、仪征、临颖和温县菌株为禾谷丝核菌。

关键词:小麦纹枯病;禾谷丝核菌;细胞核染色;PCR

中图分类号:S435.121.4⁺9 文献标识码:A 文章编号:1000-2286(2010)01-0073-05

Biological Characteristics and Genotype Identification of *Rhizoctonia* spp. in Different Provinces

CHEN Jian-hua^{1,2}, XING Jin-cheng^{1,3}, ZHANG Rong-rong², ZHANG Xu^{1*}, CHEN Huai-gu¹, MA Hong-xiang¹

(1. Key Laboratory of Crop Genetic Improvement and Breeding in East China, Ministry of Agriculture, Key Laboratory of Jiangsu Province for Agrobiological, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. College of Agriculture, JAU, Nanchang 330045, China; 3. College of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Representative *Rhizoctonia* isolates, collected and purified from diseased wheat stem in Yangzhou, Yizheng, Gaoyou of Jiangsu Province, Luan of Anhui Province, Linying and Wenxian of Henan Province in 2008 were tested for biological characteristics. All the isolates could grow on the medium with pH in the range from 4 to 9 and temperature in the range from 20 °C to 25 °C, of which the optimal pH and temperature were 5 and 22.5 °C, respectively. Isolates could grow well on PSA medium better than on PDA medium, improved PDA medium, Czapek medium and maize medium. The Safranin O-KOH dyeing results preliminarily indicated that isolates from Yangzhou, Yizheng, Linying and Wenxian were *Rhizoctonia cerealis* while isolates from Gaoyou and Luan were *Rhizoctonia solani*. Gaoyou isolate grew fast but Luan isolate grew slowest

收稿日期:2009-10-13 修回日期:2009-11-09

基金项目:国家863计划项目(2006AA100102)和现代农业产业技术体系(nycytx-03)

作者简介:陈健华(1983-)男,硕士生,主要从事植物病害诊断与防治研究;*通讯作者:张旭 E-mail:xuzhang@jaas.ac.cn。

although both isolates had thick and dense hypha. PCR amplification with specific primers indicated that isolates from Yangzhou, Yizheng, Linying and Wenxian were *Rhizoctonia cerealis*.

Key words: wheat sharp eyespot; *Rhizoctonia cerealis*; nuclear dyeing; PCR

小麦纹枯病是分布范围甚广的病害之一^[1-2],早在 1934 年即有该病发生的报道。目前,该病在我国小麦产区发生呈蔓延之势,危害也逐步加重。我国小麦纹枯病主要发生在江淮流域及黄河中下游冬麦区,尤以江苏、安徽、山东、河南、陕西、湖北及四川等省麦区发生普遍且危害严重。一般病田病株率为 10%~20%,重病田块病株率可达 60%~80%,特别严重田块的枯白穗率高达 20%以上。小麦纹枯病发病越早,损失越重,轻则减产 5%~10%,重则减产 20%~40%,甚至造成枯孕穗、枯白穗,颗粒无收。故小麦纹枯病的防治,越早越好。

一些学者^[3-5]认为,引起中国小麦纹枯病的病原有禾谷丝核菌和立枯丝核菌 2 个种,以前者为主。根据与菌丝融合群标准菌株测试,已明确引致我国小麦纹枯病的病原菌主要是禾谷丝核菌的 CAG-1 (即 AG-D) 融合群,其次是立枯丝核菌的 AG-5 和 AG-4 融合群等^[6]。为明确小麦纹枯病菌之间的关系,本研究于 2008 年春分别在江苏、安徽、河南等小麦主产区采集了纹枯病菌标样,拟从该病原菌的生物学特性和基因型方面进行初步研究,旨在为进一步制定小麦纹枯病的综合治理措施奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试病原菌 2008 年春,从江苏省扬州、高邮、仪征、安徽省六安及河南省临颖和温县采集纹枯病症状典型的小麦植株,分离纯化得到 30 个纹枯病菌。分别选取各地区代表性菌株高邮 RG04、临颖 RH58、温县 RH01、扬州 RY01、仪征 RY07 和六安 RL01 等 6 个菌株进行试验。菌株 RY01 用于培养基、温度和 pH 值对病原菌生长的影响实验。

1.1.2 供试培养基 PDA 培养基:马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 18 g、蒸馏水 1 000 mL;PSA 培养基:马铃薯 200 g、蔗糖 20 g、琼脂 18 g、蒸馏水 1 000 mL;改良 PDA 培养基:在原有 PDA 培养基中加维生素 B₁ 5 mg/L;查彼(Czapek)固体培养基:硝酸钾 2 g、磷酸氢二钾 1 g、氯化钾 0.5 g、硫酸镁 0.5 g、硫酸亚铁 0.01 g、蔗糖 30 g、琼脂 17 g、蒸馏水 1 000 mL;玉米粉琼脂培养基:玉米粉 300 g、琼脂 17 g、蒸馏水 1 000 mL。

1.1.3 供试染色液 番红 O-KOH 染色液 [ρ (番红 O) = 0.5% 溶液 6 mL、 ρ (KOH) = 3% 溶液 6 mL、甘油 3 mL、蒸馏水 85 mL] 和 Giemsa 染色液 [2 份 0.2 mol/L 磷酸缓冲溶液 (pH = 7) 和 1 份 Giemsa 母液混合]。

1.2 方法

1.2.1 病菌分离与纯化 从小麦茎基部切取小块纹枯病健交界组织,经体积分数 φ (乙醇) = 70% 和 ρ (升汞) = 0.1% 消毒并用无菌水冲洗干净后,移植在 PDA 平板上培养,单菌丝纯化,将纯化病菌分离物转接在斜面试管中,低温 (4 °C) 保存。

1.2.2 纹枯病菌生物学特性观察 (1) 不同病原菌在 PDA 培养基上的生长。挑取培养 3 d 不同地区纹枯菌的菌丝转移到 PDA 培养基平板中央,25 °C 条件下恒温培养,定期测量菌丝生长量,观察菌落形态及菌核形成情况。

(2) 培养基对小麦纹枯病菌生长的影响。将 RY01 分别接种到 PDA、PSA、改良 PDA、查彼培养基和玉米粉 5 种培养基上,每处理 3 次重复,在 25 °C 条件下恒温培养,定期测量菌丝生长量,观察菌落形态及菌核形成情况。

(3) 温度对小麦纹枯病菌生长的影响。温度设 20、22.5、25、27.5 °C 共 4 个处理,每处理重复 3 次。挑取培养 3 d 的菌丝转接到 PDA 平板中央,分别置于 4 个处理温度条件下培养,定期测量菌丝生长量。

(4) pH 值对小麦纹枯病菌生长的影响。pH 值设 4、5、6、7、8、9 共 6 个处理,每处理重复 3 次。挑取培养 3 d 的菌丝转移到不同 pH 值的 PDA 培养基平板中央,22.5 °C 恒温培养,定期测量菌丝生长量。

1.2.3 细胞核数目观察 采用新配制的番红 O-KOH 染色液^[7-9],参照黄江华和周而勋等^[8]的方法对培养菌丝进行染色,在显微镜下观察菌丝细胞核的数目。

1.2.4 小麦纹枯病菌 DNA 提取 挑取培养 3 d 纹枯病菌的菌丝接种于马铃薯葡萄糖液体培养基中培养 1 周后,菌丝经 3 层无菌纱布过滤,冷冻烘干,碾碎成菌粉,装入 1.5 mL 离心管中,用改进 CTAB 法^[10]

提取病菌 DNA, -20 °C 下保存备用。

1.2.5 PCR 检测 选取禾谷丝核菌特异性 PCR 引物^[10-11]PF1 5' <CGGTTGTAGCTGGGTCTTTTA <3', PR1 5' <TCCTCCGCTTATTGATATGC <3', 对病原菌进行基因型鉴定。参照 Pascual 等^[12]的方法, 采用 20 μL 反应体系。在 PTC-100™ 热循环仪中进行条件为 94 °C 预变性 4 min 94 °C 变性 1 min 58 °C 30 s 72 °C 延伸 1 min 36 个循环 72 °C 延伸 10 min。PCR 扩增产物采用 12 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测, 分子量标准为 DL 2 000 bp Marker(Takara 公司)。

2 结果与分析

2.1 不同病原菌培养性状的观察

各地分离菌的生长速度存在明显差异, 其中高邮分离纹枯菌生长最快, 其次为河南临颖、温县、扬州的分离菌, 再次是仪征分离菌, 六安分离菌的生长速度最慢。在菌落颜色变化方面, 高邮和六安颜色差异较大, 高邮分离菌的颜色由白色到淡黄, 灰黄直至灰橘色, 六安分离菌则由白色到淡粉直至粉红色; 河南临颖、温县、扬州和仪征分离纹枯菌形成的菌落颜色变化接近, 均由白色到淡灰, 灰褐直至黑褐色(表 1)。

表 1 不同地区小麦纹枯病菌在 PDA 培养基上的菌落生长速度及菌落基质颜色的比较

Tab. 1 Colony growth speed and color of *Rhizoctonia* spp.

供试菌株 Test strains	菌落基质颜色变化 Change of colony colour	第 5 d 菌落直径/cm Colony diameter at 5 th day	差异显著性(0.05) Significant difference(0.05)
高邮 RG04	白→淡黄→灰黄→灰橘 White→ light yellow→ greyish yellow→ pearl orange	8.60 ± 0.20	a
临颖 RH58	白→淡灰→灰褐→黑褐 White→ oyster white→ grey brown→ black brown	7.45 ± 0.65	b
温县 RH01	白→淡灰→灰褐→黑褐 White→ oyster white→ grey brown→ black brown	7.45 ± 0.25	b
扬州 RY01	白→淡灰→灰褐→黑褐 White→ oyster white→ grey brown→ black brown	7.13 ± 0.87	b
仪征 RY07	白→淡灰→灰黄→灰褐 White→ oyster white→ greyish yellow→ grey brown	5.85 ± 0.65	c
六安 RL01	白→淡粉→粉红 White→ light pink→ pink	4.03 ± 0.17	d

2.2 小麦纹枯病菌在不同培养基中生长速度的比较

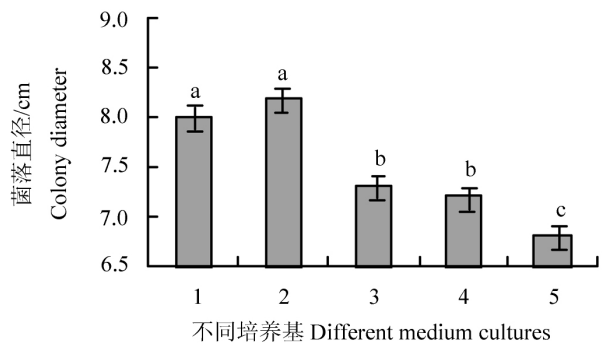
小麦纹枯病菌在 PSA、PDA、改良 PDA、查彼固体培养基、玉米培养基上生长速度不同, 在 PSA 培养基上生长速度最快, 玉米培养基上生长速度最慢(图 1)。

2.3 小麦纹枯病菌在不同温度环境中生长速度比较

小麦纹枯病菌在不同温度环境中的生长速度比较显示 22.5 °C 时生长速度最快 27.5 °C 时生长速度明显下降(图 2)。

2.4 小麦纹枯病菌在不同 pH 值 PDA 培养基中生长速度比较

小麦纹枯病菌在不同 pH 值 PDA 培养基



1. PDA 培养基 2. PSA 培养基 3. 改良 PDA 培养基 4. 查彼培养基 5. 玉米粉培养基。

1. PDA medium 2. PSA medium 3. Improve PDA medium 4. Czapek medium 5. Maize medium.

图 1 不同培养基对小麦纹枯病菌生长的影响

Fig. 1 Effect of medium on the growth of *Rhizoctonia* aspp.

中生长速度研究 结果显示 在 pH 值分别为 4 和 8 时生长减缓 pH 值为 9 时生长最慢。pH 值为 5 时, 生长速度最快(图 3)。

2.5 小麦纹枯病菌细胞数目的观察

通过番红 O - KOH 和 Giemsa 染色液染色比较结果表明, 番红 O - KOH 染色效果要好于 Giemsa 染色, 与黄江华等研究相符^[8]。小麦纹枯病菌细胞核数目的观察, 其中临颖、温县、扬州、仪征分离纹枯菌为双核、高邮和六安分离的纹枯菌为多核(图 4)。

2.6 小麦纹枯病菌 PCR 检测

使用禾谷丝核菌特异性引物对不同分离菌进行 PCR 扩增, 结果显示扬州、仪征、临颖和温县分离菌 DNA 可以扩增出明显条带, 与江苏省农科院植保所保存的禾谷丝核菌 DNA 扩增结果一致, 与双多核鉴定一致。六安和高邮分离菌没有扩增出条带(图 5)。

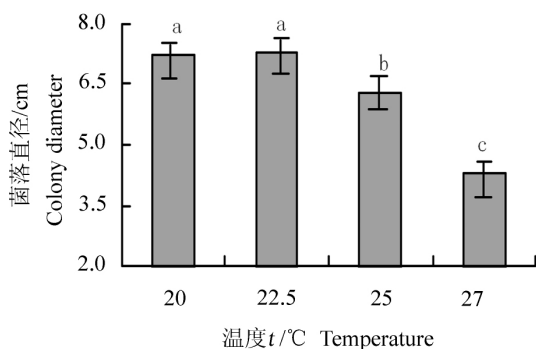


图 2 不同温度对小麦纹枯病菌生长的影响

Fig.2 Effect of temperature on the growth of *Rhizoctonia* spp.

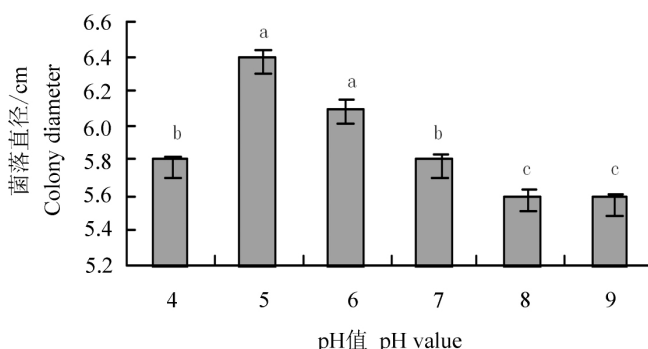
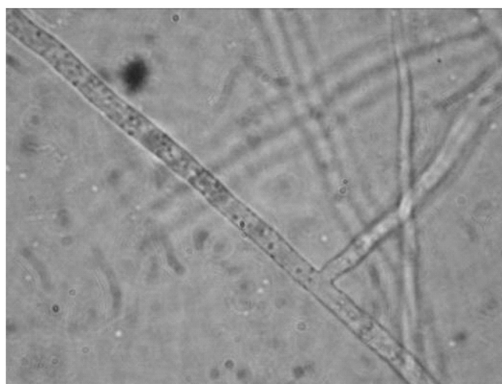


图 3 不同 pH 值对小麦纹枯病菌生长的影响

Fig.3 Effect of pH value on the growth of *Rhizoctonia* spp.



A



B

A: 双核禾谷丝核菌, B: 多核立枯丝核菌。

A: *Rhizoctonia Cerealis*, B: *Rhizoctonia solani*.

图 4 病原菌番红 O - KOH 染色结果

Fig.4 The Safranin O - KOH dyeing results of pathogen

3 讨 论

通过对纹枯病菌生物学特性的研究发现, 小麦纹枯菌最适生长温度为 22.5 $^\circ\text{C}$ 27.5 $^\circ\text{C}$ 时生长受到明显抑制; 适合 pH 值的生长范围是 4 ~ 9, 最适 pH 值为 5, 而陈延熙等研究的最适 pH 值为 6, 这可能与不同地区的菌种差异性有关。不同培养基对菌丝的生长也有影响, 在不同培养基上的生长速度不同, 形成菌核的时间也不同。可根据不同的需要选择同步的培养基。

本研究中, 对小麦纹枯病菌细胞核观察, 采用黄江华和周而勋等^[8]的插片法, 使用番红 O - KOH 染色液染色, 效果要好于 Giemsa 染色, 与李永娟等^[8, 13]研究相符。采用插片法, 制成的装片易于得到单层细胞, 易于观察单个菌丝细胞。染色的时间控制在 1 ~ 3 min 为宜, 染色效果好。

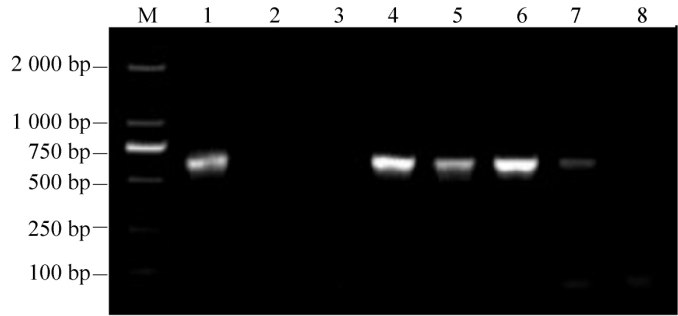
本研究对对江苏、安徽、河南等省六个县市的小麦纹枯病菌进行了分子鉴定,结果显示,扬州、仪征、临颖和温县分离菌属于典型的禾谷丝核菌,这些菌株的细胞学分析也表明它们为双核纹枯病菌。高邮和六安分离菌均未扩增出特异性条带,这两个病原菌是否属于立枯丝核菌,有待进一步鉴定。通过对江苏、安徽、河南等省六个县市的小麦纹枯病菌生物学特性观察、细胞核数目观察及种属特异性分子检测,可初步明确在江苏、安徽、河南等省引起小麦纹枯病的主要致病病原菌是禾谷丝核菌,这与 20 世纪 80、90 年代陈延熙、夏正俊、喻大昭、史建荣等^[3,5,14-15]研究结果是一致的。

许多抗性鉴定结果表明,目前生产

上缺乏抗纹枯病品种,而且育种单位暂时还未获得稳定可靠的纹枯病抗源,因此近几年很难通过使用抗性品种实现对纹枯病的控制。小麦纹枯病的发生流行呈现过冬前和拔节期两个发病高峰。本研究了解江苏、安徽、河南等省不同市县小麦纹枯病菌的最适生长温度、酸碱度、生长繁殖所需的营养物质以及分子研究,可以有针对性地预测我国小麦主产区纹枯病的流行趋势和早期准确诊断,进而可以及时采用相应的防治措施,减轻纹枯病菌对小麦的危害有重要意义。

参考文献:

- [1] Lipps P E, Herr L J. Etiology of *Rhizoctonia cerealis* in sharp eyespot of wheat [J]. *Phytopathology*, 1982, 72(12): 1574 - 1577.
- [2] 庄巧生, 杜振华. 中国小麦育种研究进展 [M]. 北京: 农业出版社, 1996: 266 - 274.
- [3] 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.
- [4] 李清铎, 夏正俊. 江苏几种作物病原丝核菌生物学特性研究 [J]. *江苏农学院学报*, 1988, 9(3): 23 - 26.
- [5] 夏正俊, 李清铎. 江苏省大、小麦纹枯病病原学的初步研究 [J]. *植物病理学报*, 1989, 19(3): 135 - 139.
- [6] 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.
- [7] Bandoni R J. Safranin O as a rapid nuclear stain for fungi [J]. *Mycologia*, 1979, 71(4): 873 - 874.
- [8] 黄江华, 杨媚, 周而勋, 等. 丝核菌细胞核染色技术的研究 [J]. *仲恺农业技术学院学报*, 2001, 14(4): 13 - 17.
- [9] Yamamoto D T, Vchida J Y. Rapid nuclear staining of rhizotonia solani and related fungi with acridine orange and with safranin O [J]. *Mycologia*, 1982, 74(1): 145 - 149.
- [10] 陈怀谷, 方正, 陈厚德, 等. 小麦纹枯病菌核糖体内转录区序列比较 [J]. *植物病理学报*, 2005, 35(1): 24 - 29.
- [11] 陆琼娴, 杨慧勇, 王兵, 等. 小麦茎基部土传真菌病害的分子诊断 [J]. *麦类作物学报*, 2008, 28(3): 531 - 536.
- [12] Pascual C B, Toda T, Raymondo A D, et al. Characterization by conventional techniques and PCR of *Rhizoctonia solani* isolates causing banded leaf sheath blight in maize [J]. *Plant Pathology*, 2000, 49(1): 108 - 118.
- [13] 李永娟, 刘顺, 朱杰华. 河北省小麦及玉米纹枯病菌生物学特性初步研究 [J]. *中国农业科技导报*, 2007, 9(1): 47 - 51.
- [14] 喻大昭, 杨小军, 杨立军. 湖北省小麦纹枯病病原菌丝融合群研究 [J]. *湖北农业科学*, 2000, 3(3): 39 - 42.
- [15] 史建荣, 王裕中, 陈怀谷, 等. 小麦纹枯病菌的苗丝融合群及其致病力测定 [J]. *江苏农业科学*, 1993: 25 - 29.



M: DNA 分子标准; 1: 双核禾谷丝核菌; 2: 禾谷镰刀菌; 3 ~ 8: 六安、临颖、温县、扬州、仪征和高邮分离菌。

M: DL2000 Marker, 1: representative *Rhizoctonia cerealis*, 2: *Fusarium graminearum*, 3 ~ 8: Isolates from Liu'an, Linying, Wenxian, Yangzhou, Yizheng and Gaoyou respectively.

图 5 病原菌种属特异性 PCR 扩增结果

Fig. 5 PCR products of pathogens using *Rhizoctonia cerealis* specific primer