

# 立枯丝核菌 AG - 1 IB 引起白菜、薄荷、莴苣叶腐病的研究\*

段春芳<sup>1</sup>, 杨根华<sup>2\*\*</sup>, 尼章光<sup>1</sup>, 刘光华<sup>1</sup>, 吴华英<sup>2</sup>

(1. 云南省农业科学院热带亚热带经济作物研究所, 云南 保山 678025;

2. 云南农业大学, 云南省植物病理重点实验室, 云南 昆明 650201)

**摘要:** 云南省西双版纳地区白菜、薄荷、莴苣叶腐病频繁发生, 从有叶腐症状的病害组织中分离到立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*) 菌株。根据培养性状、菌丝直径、细胞核数目、融合群反应、5.8 s rDNA 片段序列分析及致病性测定, 结果表明引起白菜、薄荷、莴苣叶腐病的病原菌为立枯丝核菌 AG - 1 IB 菌丝融合群。

**关键词:** 叶腐病; 立枯丝核菌 AG - 1 IB; 白菜; 薄荷; 莴苣

中图分类号: S 436.3 文献标识码: A 文章编号: 1004 - 390X (2008) 03 - 0422 - 04

## Occurrence of Foliar Rot of Chinese Cabbage, Mint and Lettuce Caused by *Rhizoctonia solani* AG-1 IB in China

DUAN Chun-fang<sup>1</sup>, YANG Gen-hua<sup>2</sup>, NI Zhang-guang<sup>1</sup>, LIU Guang-hua<sup>1</sup>, WU Hua-ying<sup>2</sup>

(1. Tropical and a Subtropical Cash Crops Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Science, Baoshan 678025, China;

2. Phytopathology Lab of Yunnan Province, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;)

**Abstract:** Leaf rot was frequently observed in Chinese cabbage, mint and lettuce in Xishuangbanna district of Yunnan Province, China. *Rhizoctonia solani* isolates were collected from the diseased leaves and were identified to belong to anastomosis group AG - 1 IB based on cultural characteristics, mycelial diameters, nuclear numbers, anastomosis reaction, analysis of the ITS - 5.8 s rDNA region and the pathogenicity test.

**Key words:** foliar rot; *Rhizoctonia solani* AG - 1 IB; Chinese cabbage; mint; lettuce

丝核菌 (*Rhizoctonia*) 是一类在自然界中广泛存在的土壤习居真菌, 此属真菌能引起很多种病害, 能引起蔬菜组织腐烂、枯萎。据相关报道, AG - 4, AG - 2 - 1 通常引起甘蓝、花椰菜和印度芥菜倒伏、条纹茎枯<sup>[1-3]</sup>。AG - 1 引起甘蓝叶腐、幼叶腐烂<sup>[2]</sup>。白菜 [*Beassica pekinensis* (Lour.) Rupr.]、薄荷 (*Mentha haplocalyx* Briq.)、莴苣 (*Lactuca sativa* Linn.) 是世界广泛种植的蔬菜。从2003年12月至2004年7月, 西双版纳地区的

白菜、薄荷、莴苣叶腐病频繁发生。对白菜、薄荷、莴苣的病组织进行分离、鉴定, 发现由丝核菌引起白菜、薄荷、莴苣的植株叶片萎焉、根部枯萎、组织腐烂, 危害严重, 造成蔬菜苗期立枯、成熟期叶片腐烂, 使蔬菜品质下降、产量降低。

本研究报道了白菜、薄荷、莴苣的叶腐病的田间症状, 通过组织分离培养鉴定出病原物, 并划分融合群、进行致病性测定, 利用真菌通用引物 ITS1 和 ITS4 进行分离物糖体基因 ITS 区段的

收稿日期: 2007 - 05 - 14 修回日期: 2007 - 07 - 10

\* 基金项目: 国家自然科学基金项目资助 (30660006); 云南自然科学基金项目资助 (2006C0031Q)

作者简介: 段春芳 (1983 -), 女, 云南鹤庆人, 研究实习员, 在读硕士, 主要从事热区植物病理学研究。

E - mail: jianfangduan@126.com

\*\* 通讯作者

PCR 扩增、分子克隆、测序澄清其种群的遗传多样性。AG-1 IB 引起白菜、薄荷、莴苣叶腐病在这方面国内外还没有详细报道和更深入研究,是属于新发现的由丝核菌引起的一种新型蔬菜病害。

## 1 材料与方法

### 1.1 田间症状调查

在云南省西双版纳地区蔬菜种植地进行症状观察,分别对白菜、薄荷、莴苣的不同蔬菜种类、不同生育期进行调查。

### 1.2 病原菌的分离和纯化

分离方法采用常规组织分离法<sup>[4]</sup>,将采集样品的病健交界处剪成小段,用75%酒精消毒30 s,0.1%升汞消毒3 min,然后用灭菌水换洗3次,待其晾干后,将其移植接种到2%水琼脂平板上,25℃下培养1~2 d后,分离出的菌丝经镜检确认是丝核菌后,将菌丝接种到PDA平板上,置25℃恒温下培养。1周后观察PDA培养基上病原菌的形态特征,并对病原真菌进行初步鉴定。

### 1.3 病原菌形态观察

分离菌株经HCl-Giemsa染色后,镜检其菌丝形态,细胞核数目,确定出该病原菌是多核丝核菌或是双核丝核菌。分离菌株的形态特征描述参照魏景超的《真菌鉴定手册》<sup>[5]</sup>。

### 1.4 融合反应

Parmeter 1969年确立按菌丝融合区分丝核菌,用从病害组织上分离到的分离菌株和标准菌株做融合反应确定是否属于同一融合群。本次研究采用参考陈延熙等<sup>[6,7]</sup>改进的玻片配对法,灭菌矩形玻璃纸放置于2%水琼脂上,将分离菌株和标准菌株配对放在玻璃纸条带的两端,将培养皿放到25℃下培养,直到两端菌丝边缘尖端接触,在1~2 h后在显微镜下观察两个不同菌株的菌丝融合情况。 $C_0$ 代表不融合, $C_2$ 代表杀死融合, $C_3$ 代表完全融合。

### 1.5 致病性测定

分离菌株采用成株期致病性测定。将分离菌株接种于PDA上,在25℃恒温培养3~4 d后,用大约20 g已灭菌土壤覆盖在培养皿中的菌丝上,在25℃恒温培养3~4 d,使丝核菌完全侵染土壤,用大约7 g被菌丝侵染的土壤,无菌下接种到种有白菜、薄荷、莴苣的花盆中。按白天16 h温度为30℃,夜晚8 h温度16℃培养,7 d后

观察症状。

### 1.6 DNA 的提取

分离菌株接种于液体PDA中<sup>[8,9]</sup>,培养出的菌丝,用液氮充分研磨至粉末状加入1 mL的DAN提取缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl pH 8.0; 100 mmol/L EDTA; 250 mmol/L NaCl)并在60℃条件下保温30 min,离心后取上清液加入等体积的饱和酚(10 000 r/min离心10 min)振荡混合,取上清液,加入等体积的25:24:1的饱和酚:氯仿:异戊醇,振荡混合,离心取上清液,加入等体积的24:1的氯仿:异戊醇,振荡混合,离心取上清液,加2倍体积的冰无水乙醇置于-20℃冰箱沉淀DNA。最后用70%冰乙醇漂洗DNA 2次,真空干燥或自然风干,待其完全干燥后,加入TE缓冲液溶解DNA放入-30℃待用<sup>[10,11]</sup>。

### 1.7 5.8s rDNA-ITS 序列分析

引物为ITS1和ITS4<sup>[12,13]</sup>。扩增反应在PCR仪Perkin Elmer上进行,PCR反应体系为50 μL。如下PCR循环:94℃预变性3 min,循环1次;94℃变性1 min,51℃退火1 min,72℃延伸1 min,30次循环;最后72℃延伸10 min。PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳,经溴化乙锭染色后,在紫外透射台上观察。质粒载体pGEM-T-easy与DNA特异片段连接反应、转化由COHEN<sup>[14]</sup>等冰冷氯化钙法制备的JM109感受态细胞,经蓝-白筛选法筛选,碱裂解法提取质粒<sup>[11]</sup>,电泳鉴定特异片段的插入情况。经筛选鉴定后的重组质粒送大连TaKaRa公司进行序列测定,并通过软件(DNAMAN, Version 4.0)进行5.8s rDNA-ITS序列分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 症状

植株发病初期叶片和叶柄出现不规则的水渍状灰色病斑,椭圆形或不规则形,中央灰褐色,边缘深褐色,常多个病斑汇合连片似云纹状斑块,后期湿度大时病斑扩大,病害组织腐烂,成褐色症状(图1)。天晴时病斑呈褐色,逐渐萎焉枯萎脱落,并蔓延至叶柄和分枝处,严重时全株枯死。

### 2.2 分离物的特征描述

分离菌株菌丝经HCl-Giemsa染色后用显微镜数细胞核。结果从白菜、薄荷、莴苣叶腐病上分离到的丝核菌为多核丝核菌。

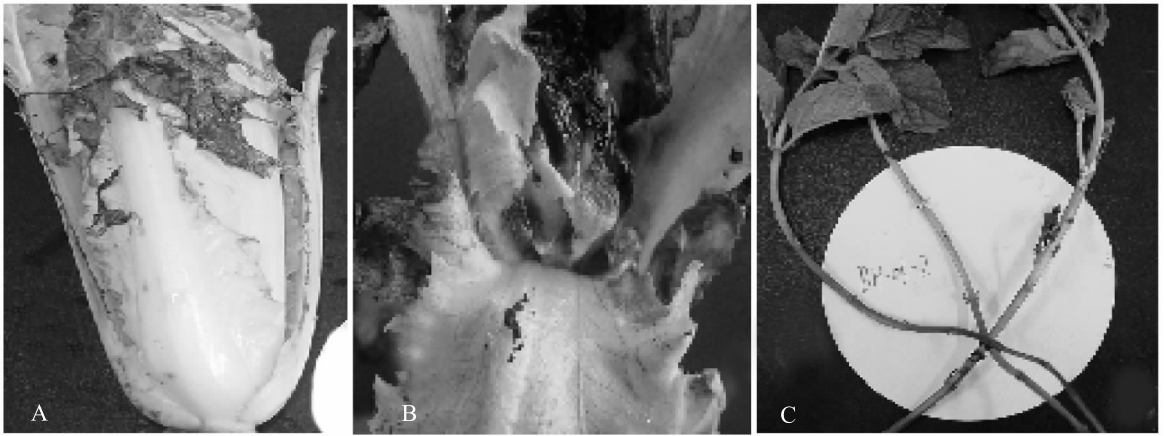


图 1 白菜 (A)、莴苣 (B)、薄荷 (C) 叶腐症状  
Fig. 1 Symptoms of foliar rot on Chinese cabbage (A), Lettuce (B) and Mint (C)

### 2.3 分离菌株的鉴定

融合群反应结果表明,从白菜、薄荷、莴苣叶腐病上分离到的丝核菌为 AG-1 群。成株期致病性测定结果表现为与田间症状相同。用引物 ITS1 和 ITS4 扩增了所分离菌株的核糖体基因 ITS 区段,1% 琼脂糖凝胶电泳检查 PCR 扩增产物,结果为分离菌株的核糖体基因 ITS 区段大小为 750 bp 左右目的片段,这与预期片段的大小一致。5.8 s rDNA-ITS 序列进一步分析表明,从白菜、薄荷、莴苣中分离到的立枯丝核菌为 AG-1IB 亚群 (图 2)。

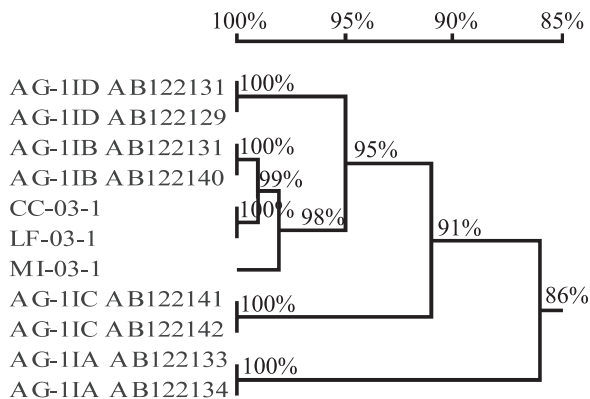


图 2 11 个丝核菌菌株的 5.8 s rDNA-ITS 序列系统聚类树状图

Fig. 2 Homologic tree constructed by analyzing 5.8 s rDNA-ITS nucleotide sequences from 11 strains of *Rhizoctonia solani*

### 3 讨论

研究表明引起西双版纳地区白菜、薄荷、莴苣叶腐病的病原菌为立枯丝核菌 AG-1 IB。据报道,在西双版纳地区立枯丝核菌 AG-1 IB 能引

起瓢白、中国芥菜叶腐病<sup>[15]</sup>,在巴西<sup>[16]</sup>和德国<sup>[17]</sup>,立枯丝核菌 AG-1 IB 能引起莴苣叶腐病。据陈延等<sup>[18]</sup>的研究,AG-1 IB 则只有类似纹枯病症状的鹅观草和狗尾草上才能分离到,据黄江华等<sup>[19]</sup>的研究,AG-1 IB 可从玉米纹枯病中分离到,从蔬菜病害部位能广泛中分离到 AG-4 群,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>[18,20]</sup>,而本研究从十字花科白菜病害部位分离到的是 AG-1 IB,从西双版纳地区白菜、薄荷、莴苣等蔬菜叶腐病症状病株中只分离到 AG-1IB 亚群,这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。由丝核菌引起白菜、薄荷、莴苣的植物叶片萎焉、根部枯萎、组织腐烂病害症状危害严重,造成蔬菜苗期立枯、成熟期叶片腐烂,使蔬菜品质下降、产量降低。AG-1 IB 引起白菜、薄荷、莴苣叶腐病在这方面国内外还没有详细报道和更深入研究,是属于新发现的由丝核菌引起的一种新型病害。

#### [参考文献]

- [1] SHIRAIISHI H, Y ENAMI, S OKANO. *Folsomia hidakana* (Collembola) prevents damping-off disease in cabbage and Chinese cabbage by *Rhizoctonia solani* [J]. *Pedobiologia*, 2003, 47 (1): 33-38.
- [2] ABAWI GS, MARTIN S B. *Rhizoctonia* foliar blight of cabbage in New York State [J]. *Plant disease*, 1985, 69 (2): 158-161.
- [3] GUPTA DK, BASU KC. Record of leaf blight of broad bean (*Vicia faba* L.) in Manipur [J]. *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology*, 1986, 163 (3): 353-354.

- [4] 方中达. 植物研究方法 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1979.
- [5] 魏景超. 真菌鉴定手册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- [6] 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 - 144.
- [7] 陈素清, 吴斌. 四川棉花立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani* Kuehn) 菌丝融合群研究 [J]. 西南农业学报, 1999, 12 (1): 56 - 60.
- [8] 易润华, 梁承邺, 朱西儒, 等. 广东省水稻纹枯病菌遗传多样性与致病力分化的研究 [J]. 热带亚热带植物学报, 2002, 10 (2): 161 - 170.
- [9] 周而勋, 朱西儒, 易润华. 简化 CTAB 法快速微量提取丝状真菌 DNA [J]. 湛江海洋大学学报, 2003, 23 (6): 72 - 73.
- [10] 彭秀玲, 袁汉英, 谢毅, 等. 基因工程实验技术 (第 2 版) [M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1997.
- [11] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1993.
- [12] WHITE TJ, BRUNS T, LEE S. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [M]. San Diego: Academic Press, 1990.
- [13] 杨佩文, 李家瑞, 杨勤忠, 等. 根肿病菌核糖体基因 ITS 区段的克隆测序及其在检测中的应用 [J]. 云南农业大学学报, 2003, 18 (3): 228 - 233.
- [14] COHEN SN, A. C. Y. CHANG, H. W. Boyer. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro [J]. Proc Natl Acad Sci, 1973, 70 (11): 3240 - 3244.
- [15] YANG G H, CHEN H R, NAITO S, et al. Occurrence of foliar rot of pak choy and Chinese mustard caused by *Rhizoctonia solani* AG-1 IB in China [J]. Journal of General plant pathology, 2005, 71: 377 - 379.
- [16] KURAMAE E E, BUZETO A L, CIAMPI M B, et al. Identification of *Rhizoctonia solani* AG 1-IB in lettuce, AG 4 HG - I in tomato and melon, and AG 4 HG - III in Broccoli and Spinach, in Brazil [J]. European Journal of Plant Pathology, 2003, 109 (4): 391 - 395.
- [17] GROSCHE R, KOFOET A, ELAD Y, et al. Characteristics of *Rhizoctonia solani* isolates associated with bottom rot of lettuce [R]. Turkey, 2002.
- [18] 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.
- [19] 黄江华, 周而勋, 戚佩坤. 广州地区 13 种作物丝核菌的鉴定 [J]. 华南农业大学学报, 2003, 24 (4): 24 - 27.
- [20] 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.