

立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)对日本结缕草(*Zoysia japonica* steud.)的侵染过程研究

殷萍萍¹ 李珊珊¹ 王玉玲² 曾会明^{1*}

(1. 北京林业大学 草坪研究所 北京 100083)

(2. 河北省承德市丰宁气象局 河北 承德 068350)

摘要:【目的】了解立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*) AG1 IA 对日本结缕草(*Zoysia japonica* steud.) 的侵染过程及其引起的病害症状,为进一步从分子水平研究该菌的病理学侵染机制和草坪草抗病分子育种提供理论基础。【方法】通过根部接种法促使立枯丝核菌与日本结缕草无菌苗建立侵染关系,从而对其病叶率、病株率及病情指数进行统计分析,同时结合组织染色透明技术及植物组织石蜡切片对立枯丝核菌的侵染过程、感染方式进行研究。【结果】立枯丝核菌 AG1 IA 的侵染过程主要为:菌丝吸附在植物组织表面,并沿组织表面定向生长,形成侵染结构——侵染垫与组织建立密切的侵染关系。菌丝通过细胞间隙侵入植物组织内部,主要侵染植物皮层细胞及除木质部导管以外的整个维管束系统。结缕草的地上部分与地下部分组织对立枯丝核菌的侵染显现不同的寄主反应。【结论】立枯丝核菌的侵染过程主要包括吸附、定向生长、渗透、定殖 4 个部分;立枯丝核菌的侵染主要引起结缕草叶片病症;结缕草病变与菌丝直接侵染无直接联系,表明该菌具有复杂的侵染机制。

关键词: 结缕草, 立枯丝核菌, 侵染, 组织病理

The infection process of *Rhizoctonia solani* in *Zoysia japonica*

YIN Ping-Ping¹ LI Shan-Shan¹ WANG Yu-Ling² ZENG Hui-Ming^{1*}

(1. Beijing Forestry University, Turfgrass Research Institute, Beijing 100083, China)

(2. Meteorological Bureau of Fengning, Chengde, Hebei 068350, China)

Abstract: [Objective] In order to figure out the infection relationship between *Rhizoctonia solani* AG1 IA and *Zoysia japonica*, and provide a theoretical basis for further research on pathological infection mechanism, as well as molecular breeding for disease resistance of turfgrass. [Methods] *Z. japonica* was infected by *R. solani* AG1 IA through root inoculation, the disease incidence of leaves and plants, disease index were analyzed. Meanwhile, the infection process and methods was studied using histological staining transparent technology and paraffin sections. [Results] The hyphae of *R. solani* AG1 IA hyphae firstly adsorbed, and then grew directionally along the surface of the tissue, followed by the formation of infection cushion. The hyphae penetrated the tissues through intercellular spaces

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2013AA102607)

*通讯作者: Tel: 86-10-62336066; 信箱: sciinfo@bjfu.edu.cn

收稿日期: 2014-09-28; 接受日期: 2014-12-01; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-12-05

and invaded the cortical cells, and gradually extended inward the vascular system except xylem vessels. The underground and ground part of *Z. japonica* showed disparate host response against *R. solani* AG1 IA. **[Conclusion]** Infection process of *R. solani* include adsorption, directional growth, penetration, colonization. The infection of *R. solani* mainly cause *Z. japonica* leaves lesions. There are no direct correlation between *Z. japonica* lesions and infecting hyphae. This might indicate that *R. solani* has the complex mechanism of pathogenicity.

Keywords: *Zoysia japonica* steud., *Rhizoctonia solani* AG1 IA, Infection, Histopathological

真菌性病害是草坪草的主要病害,占病害总数的80%以上^[1]。丝核菌综合症亦称草坪褐斑病,由丝核菌属(*Rhizoctonia*)病原真菌引起,是草坪上危害最为严重的世界性病害之一^[2]。主要引起草坪草叶片病症,病害初期病株叶片枯黄。病害严重时期,病原菌通过菌丝生长向周围植株扩散,形成侵染中心,导致草坪早衰,形成大面积的秃斑,极大地影响草坪质量和景观,降低坪用价值^[3]。草坪草上常见的丝核菌属病原真菌有玉米丝核菌(*R. zeae*)、水稻丝核菌(*R. oryzae*)、禾谷丝核菌(*R. cerealis*)以及立枯丝核菌(*R. solani*),几乎可以侵染所有草坪草^[4]。立枯丝核菌是草坪褐斑病最主要的病原菌^[5]。立枯丝核菌依据其形态、致病性、生理学及其生态学等方面的差异可分为14个融合群(AG1-13及AG1B)^[6]。AG1融合群主要含有3个种内亚群,其中AG1 IA是由立枯丝核菌引起的草坪褐斑病中最常见的病原菌^[7]。

日本结缕草(*Zoysia japonica* steud.)是禾本科(*Gramineae*)结缕草族的一种具有多种优良特性的草坪草,广泛应用于运动场、庭院绿化的草坪建植。其多年生生长特性、温暖高湿的生长环境为褐斑病频繁发生创造了有利条件。结缕草褐斑病目前成为该草坪草成坪及其养护管理的主要限制因子^[4]。目前,国内外对该病害的研究主要集中于其生态、生物、化学防治及对寄主抗病性利用等方面^[8],对立枯丝核菌侵染水稻等寄主植物的生活史、流行病学及病理学等相关方面报道较多^[9],对结缕草的生活史、流行病学及病理学等相关方面的研究尚未见报道,使得该病害在草坪草中没有得到有效控制。本文针对立枯丝核菌(AG1 IA)感染日本结缕草,对引

起褐斑病的侵染过程、感染方式及其症状表现进行研究,为草坪草对褐斑病在抗性机制方面的研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试品种和菌株

植株材料:日本结缕草(*Z. japonica*)商品品种“Zenith”,购买于美国TMI公司(Turf Merchants Inc)。

菌株材料:立枯丝核菌(*R. solani* AG1 IA)为本实验室冻存材料,经PDA培养基(马铃薯200 g,葡萄糖20 g,琼脂15–20 g)培养活化后备用。

1.2 病原菌接种

1.2.1 植物材料制备:结缕草种子经75%次氯酸钠(NaClO)溶液(质量体积比,加入1滴Tween-20)搅拌处理1 h,无菌水洗净,控干,接种于MSMS培养基平板上^[10],每皿6粒(同一水平位置)。接种后的培养皿略倾斜置于4 000 lx光照,光周期为16 h光照,8 h黑暗,28 °C培养箱中培养,5–7周后接种病原菌^[11]。

1.2.2 病原菌接种:通过改进Perl-Treves等^[12]的接种方法,采用根部媒介接种法:以草地早熟禾(*Poa pratensis*)种子为媒介,在 1×10^5 Pa连续灭活2次后,均匀播于PDA培养基上。从活化AG1 IA菌种的PDA培养基上切取直径为4 mm的菌饼,接于含有早熟禾种子的PDA培养基上,共培养10 d(25 °C,黑暗)。将含有菌源的早熟禾种子接于结缕草幼苗根部(茎基部以下1 cm处);对照根部接种无菌的早熟禾种子。将各处理的培养皿略倾斜置于4 000 lx光照,光周期为16 h光照,8 h黑暗,28 °C培养箱中培养,分别在培养0、3、6、9、12、15、18、21、24、30、36、48、60、72、96、120 h时观察统计

并取样, 每组重复 25 次。

1.3 接菌后样品试验预处理

对培养 0、3、6、9、12、15、18、21、24、30、36、48、60、72、96、120 h 的植株进行根及叶片组织取样(含对照); 无菌水冲洗 2 min 去除未吸附的游离菌丝体(显微观察, 未被冲洗掉的菌丝紧紧地吸附在根组织上), 备用。

1.3.1 组织染色透明样品制备: 取新鲜组织样品(根取整个根部, 叶片取发病严重部位), 冰醋酸:酒精=1:5 (体积比)的混合液固定 48–72 h; 酒精乳酸酚台盼蓝混合液染色, 沸水浴 2–3 min, 室温 1 h; 2.50 g/mL 的水合氯醛溶液煮沸 20 min 脱色; 将已脱色的样品放入 50% 的乙醇进行固定^[13]; NIKON ECLIPSE 600 显微镜下观察拍照。

1.3.2 石蜡切片样品制备: 根部以接种点位置为中心, 1 mm 为半径取样, 叶片取病害严重部位, 经固定、脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、展片、贴片、烘片、脱蜡染色和封片等一系列过程^[14]; 制好厚度为 6 μm 的切片置于 NIKON ECLIPSE CI 显微镜下拍照, 观察病原菌在植物体内的侵染情况。

1.4 不同时间对结缕草发病的影响

培养 0、3、6、9、12、15、18、21、24、30、36、48、60、72、96、120 h 后统计结缕草发病情况。测定指标为病叶率、病株率; 参照方中达^[15]的方法进行测定:

$$\text{病叶率(\%)} = \frac{\text{发病叶片数}}{\text{调查总叶片数}} \times 100;$$

$$\text{病株率(\%)} = \frac{\text{发病株数}}{\text{调查叶株数}} \times 100。$$

1.5 不同时间对结缕草病情发展的影响

培养 0、3、6、9、12、15、18、21、24、30、36、48、60、72、96、120 h 后观察结缕草发病情况, 以 6 级分级法调查病情严重度^[16]: 0 级: 无病; 1 级: 第 1 叶片或叶鞘发病(从基部数); 3 级: 第 2 叶片或叶鞘及其以下各叶片、叶鞘发病; 5 级: 第 3 叶片或叶鞘及其以下叶片、叶鞘发病; 7 级: 第 4 叶片或叶鞘及其以下叶片、叶鞘发病; 9 级: 全株

发病, 枯死, 根据以下公式计算病情指数, 用 LSD 法进行方差分析:

$$\text{病情指数(Disease index, \%)} = \frac{\sum \text{各级病叶数} \times \text{相对级数值}}{\text{调查总叶片数} \times 9} \times 100。$$

1.6 数据分析

实验设置接种组及对照组 2 个处理, 每个处理 16 个时间梯度(水平), 每个时间梯度(水平)重复 25 次; 采用 Excel 2010 统计分析数据, SPSS 16.0 进行数据差异显著性分析(最小显著差法, LSD 法; $P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 侵染时间对结缕草褐斑病病情发展的影响

立枯丝核菌 AG1 IA 侵染结缕草后 0–30 h, 结缕草植株未显现任何病状, 生长正常, 与对照长势一致, 病叶率、病株率和病情指数均为 0; 侵染后 36 h, 结缕草叶片出现水渍状, 病叶率及病株率显著增加, 病情指数升高, 但与侵染后 0–30 h 相比差异不显著; 随着侵染时间的延长, 病害程度逐渐增强; 侵染后 48–96 h, 病叶率、病株率及病情指数呈上升趋势, 且两两之间达到差异显著水平($P < 0.05$), 其中, 在侵染 96 h 后病株率达到 100%, 结缕草植株全部发病; 侵染后 120 h, 病叶率与病情指数显著增加, 病株率差异不显著(表 1)。

2.2 结缕草宏观病情发展症状表现

AG1 IA 根部侵染结缕草后, 不同侵染时间对结缕草病情发展变化的影响(表 2)。侵染根部后 0–30 h, 整个植株正常生长, 长势与对照一致(图 1A)。侵染后 36 h, 植株基部第 1 片叶出现水渍状, 部分基部叶片褪绿变黄, 小部分基部叶片被少量菌丝体覆盖(图 1B); 侵染后 48 h, 植株病害由下而上纵向扩展, 受害面积扩大, 基部第 2 片叶出现病状, 叶片开始褪绿变黄, 基部第 1 片叶及叶鞘受害加重, 菌丝覆盖叶片, 部分叶片褐化, 病变现象更为明显(图 1C); 侵染后 60 h, 绝大部分植株呈现病状, 新病叶褪绿变黄, 老病叶脱水干枯, 部分叶片边缘散

表 1 侵染时间对褐斑病发病的影响
Table 1 Influence of infecting time on *Zoysia japonica* grass brown patch

时间 Time (h)	病叶率 Infected leaves (%)	病株率 Infected plants (%)	病情指数 Disease index (%)
0-30	0.00±0.00g	0.00±0.00f	0.00±0.00f
36	5.16±0.72f	26.85±2.26e	0.57±0.08f
48	11.69±0.74e	48.94±2.29d	2.09±0.73e
60	25.60±1.99d	68.93±1.60c	9.55±1.38d
72	43.25±0.73c	86.96±0.59b	23.46±0.44c
96	68.40±1.16b	100.00±0.00a	52.03±1.28b
120	90.48±1.04a	100.00±0.00a	83.32±1.74a

注：表中数据为平均值±标准差；同列不同小写字母表示处理间差异显著(LSD 法， $P<0.05$)。
Note: Values in the table are mean $\bar{x} \pm s$; Different little letters within the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level by the least significant difference test.

表 2 结缕草病情发展统计分析
Table 2 Pathological process of infected *Z. japonica*

病情严重度分级 Disease severity classification	侵染时间 Infecting time (h)	症状 Symptoms
0	0-30	植株正常生长
1	36	叶鞘基部第 1 片叶出现水渍状
3	48	基部第 2 片叶开始出现症状：褪绿变黄
5	60	基部第 3 片叶开始出现症状：散生棕褐色病斑，植株长势较弱
7	72	第 4 片叶开始出现症状，病叶卷曲枯萎，出现病斑
9	96-120	全株发病死亡

生棕褐色病斑，长势较弱(图 1D)；侵染后 72 h，植株第 4 片叶出现病状，叶片向内卷曲枯萎，老病叶病害程度加重，呈棕褐色干枯状，且散生着外层浅绿色，中层黑色，内层浅褐色的病斑(图 1E)；侵染后 96 h，所有植株全部发病，发病严重植株干枯，萎蔫，呈暗黄色至褐色，叶片上着生大量由数个小病斑融合形成的大病斑，病斑中部组织破坏，呈半透明状，边缘棕褐色(图 1F)。

2.3 显微观察立枯丝核菌根部侵染过程

AG1 IA 侵染 0-9 h 后，结缕草幼根表面未见吸附菌丝，与对照一致(图 2A)；侵染后 12 h，菌丝吸附在根表面，定向生长，缠绕(图 2B)；侵染后 24 h，根表面菌丝量增加，菌丝顶端出现分枝，局部位置继续增生，生长到一定程度，分枝间相互交织缠绕，形成侵染垫雏形，紧紧地吸附在根表面(图 2C)；侵染后 36 h，菌丝分枝间相互缠绕，纠结成团，紧紧

地贴在根表面，形成较成熟的侵染垫，部分菌丝顶端膨大变粗，生出短而粗的侧枝，呈足形(图 2D)；侵染后 48 h，菌丝继续沿侵染点位置纵向扩展，进行再侵染(图 2E)；随着侵染时间的延长，根表面吸附的菌丝量日益增多，侵染的面积逐渐扩大；侵染 96 h 后，几乎整个根部被菌丝缠绕覆盖(图 2F)。

2.4 显微观察立枯丝核菌根部定殖过程

立枯丝核菌 AG1 IA 侵染 0-9 h 后，根组织周围未见散落的菌丝，根表皮细胞周围干净(图 3A)；侵染后 12 h，根组织周围散落少量菌丝，根组织表皮细胞及其细胞间隙未见菌丝侵入(图 3B)；侵染后 24 h，菌丝通过表皮层细胞间隙侵入根组织细胞，并向其内部扩展(图 3C)；侵染后 36 h，皮层细胞、薄壁细胞及内皮层细胞及其间隙中有菌丝侵入(图 3D)；侵染后 48 h，大量菌丝聚集在根表皮层细胞周围，侵入根皮层细胞，并向内扩展，定殖(图 3E)；

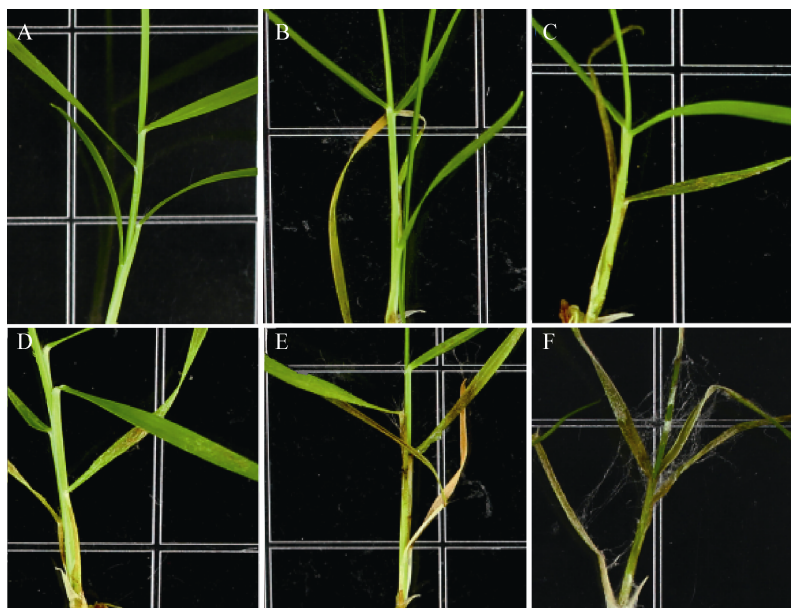


图 1 结缕草病情发展过程

Figure 1 Pathological process of infected *Z. japonica*

注: A: 对照, 未侵染的结缕草植株; B-F: 根部侵染后 36、48、60、72、96 h 结缕草病害症状发展情况。

Note: A: Uninoculated *Z. japonica* was as control; B: Disease symptoms of a *Z. japonica* 36 h after infection; C: Disease symptoms of a *Z. japonica* 48 h after infection; D: Disease symptoms of a *Z. japonica* 60 h after infection; E: Disease symptoms of a *Z. japonica* 72 h after infection; F: Disease symptoms of a *Z. japonica* 96 h after infection.

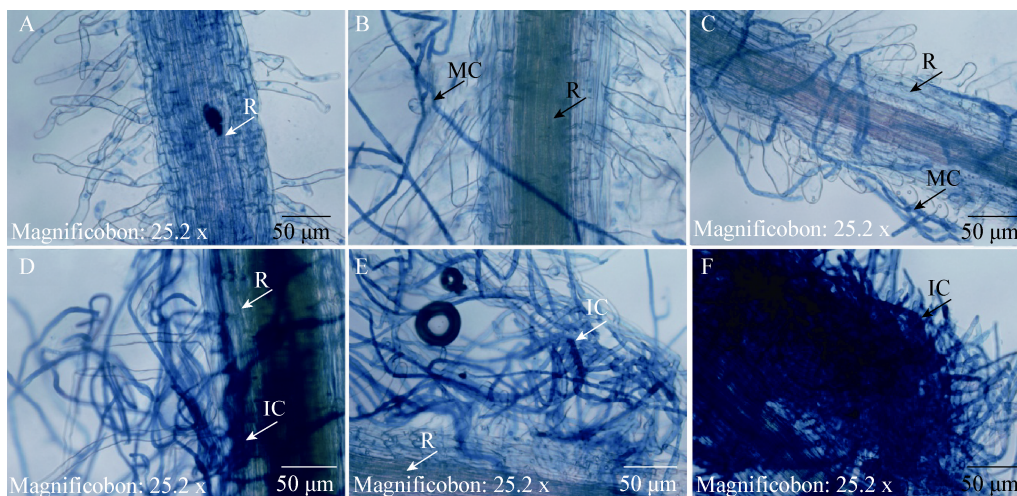


图 2 立枯丝核菌根部侵染过程观察

Figure 2 Microscopic observation of *Z. japonica* root infection process by *R. solani*

注: A: 对照, 未侵染的结缕草根; B-F: 立枯丝核菌侵染后 12、24、36、48、96 h 的结缕草根。MC: 菌丝; R: 根; IC: 侵染垫。比例尺: 50 μm; 放大倍数: 400×。

Note: A: Light microscope observation of a uninoculated *Z. japonica* root; B: Light microscope observation of a root 12 h after infection; C: Light microscope observation of a root 24 h after infection; D: Light microscope observation of a root 36 h after infection; E: Light microscope observation of a root 48 h after infection; F: Light microscope observation of a root 96 h after infection. MC: Mycelial; R: Root; IC: Infection cushion. Scale bar: 50 μm; Magnification times: 400×.

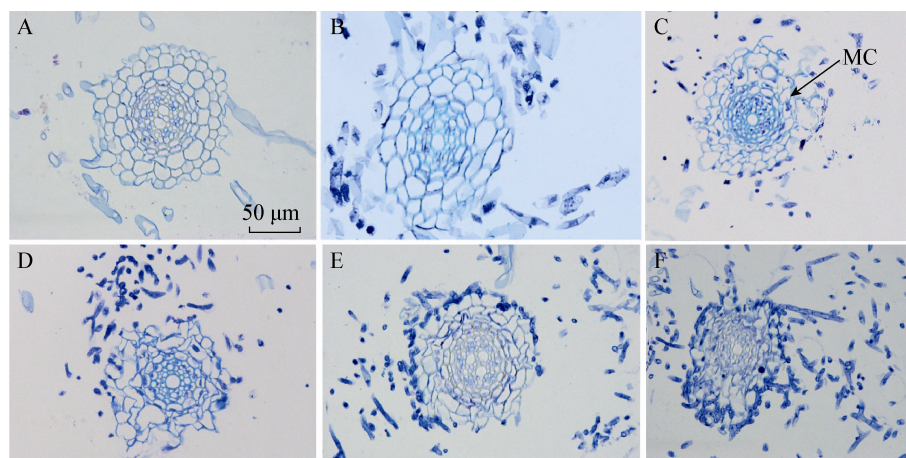


图3 结缕草根横切图

Figure 3 Microscopic observation of *Z. japonica* root cross section

注：染色较深的是菌丝，颜色较浅的是根组织，如图中箭头所示。A：对照，未侵染的根横切图；B-F：立枯丝核菌侵染后 12、24、36、48、96 h 的根横切图。MC：菌丝。比例尺：50 μm ；放大倍数：400 \times 。

Note: The dark tissue was hyphae, and the light one was root tissue. A: Light microscope observation of a uninoculated *Z. japonica* root cross section; B: Light microscope observation of a root cross section 12 h after infection; C: Light microscope observation of a root cross section 24 h after infection; D: Light microscope observation of a root cross section 36 h after infection; E: Light microscope observation of a root cross section 48 h after infection; F: Light microscope observation of a root cross section 96 h after infection. MC: Mycelial. Scale bar: 50 μm ; Magnification times: 400 \times .

侵染后 96 h，大量菌丝覆盖在根表皮层细胞周围，通过根表皮细胞间隙或直接穿透寄主细胞向内侵入至皮层细胞，经薄壁细胞向内皮层细胞及维管束鞘细胞中扩展；菌丝侵入根表皮层细胞后，向细胞内扩展至维管束区域，直至占有除木质部导管外的所有组织。病原菌侵染根细胞组织过程中，组织细胞基本保持完整，未出现细胞分离解体的现象(图 3F)。未接菌的细胞保持完整，细胞大多数呈圆形(图 3A)。

2.5 显微观察丝核菌侵入叶片过程

立枯丝核菌 AG1 IA 侵染后 0–24 h，叶片表面未见菌丝，与对照一致(图 4A–C)；侵染后 36 h，病叶组织表面发现少量菌丝(图 4D)；侵染后 48 h，病叶组织表面菌丝体数量增多(图 4E)；侵染后 96 h，叶片表面菌丝量不断增加，侵染面积扩大，菌丝顶端不断产生分枝，分枝继续增生，分枝间相互缠绕交织，大量形成侵染垫，紧紧地吸附在叶片表面，对叶片进行再侵染(图 4F)。

2.6 显微观察丝核菌叶片定殖过程

立枯丝核菌 AG1 IA 侵染后 0–30 h，叶组织细胞结构完整，未见侵染的菌丝(图 5A–C)；侵染后 36 h，水渍状叶组织细胞内未见菌丝侵入(图 5D)；侵染后 48 h，菌丝侵入叶组织细胞，少量气孔处可见侵染的菌丝(图 5E)；侵染后 96 h，大量菌丝定殖于叶肉细胞、维管束细胞及薄壁细胞，细胞变形，细胞内容物渗出，部分细胞分离解体，细胞呈坏死状(图 5F)。

2.7 立枯丝核菌对结缕草侵染过程

立枯丝核菌接触结缕草无菌苗根部，条件适宜时，菌丝活化，沿根扩展生长，形成侵染结构进行组织侵染，侵染到一定程度，植物叶片出现病变；随着侵染时间的延长，菌丝侵染程度加强，形成新的侵染结构，并沿植物纵向扩展，不断进行侵染，遍布整个植株，引起结缕草植株萎蔫死亡。立枯丝核菌侵染结缕草的整个过程如表 3 所示。

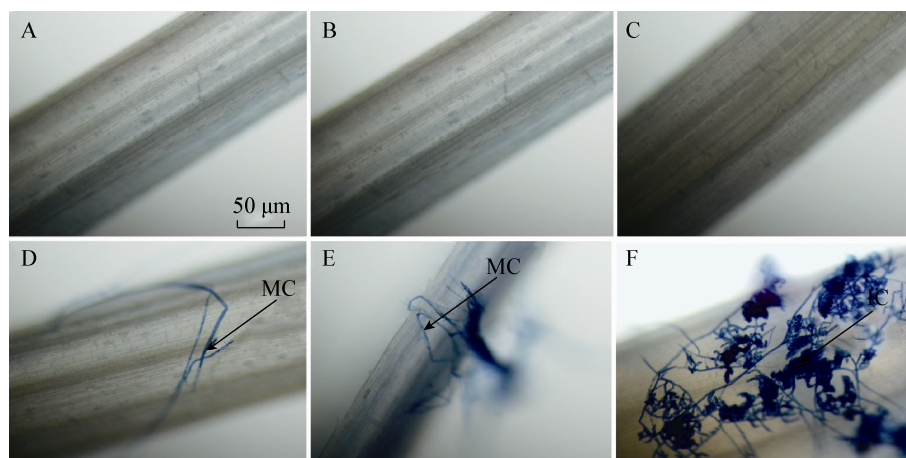


图4 立枯丝核菌叶片侵染过程观察

Figure 4 Microscopic observation of *Z. japonica* leaves infection process by *R. solani*

注: A: 对照, 未侵染的结缕草叶片; B-F: 立枯丝核菌侵染后 12、24、36、48、96 h 的结缕草叶片. MC: 菌丝; IC: 侵染垫. 比例尺: 50 μm ; 放大倍数: 400 \times .

Note: A: Light microscope observation of a uninoculated *Z. japonica* leaf; B: Light microscope observation of a leaf 12 h after infection; C: Light microscope observation of a leaf 24 h after infection; D: Light microscope observation of a leaf 36 h after infection; E: Light microscope observation of a leaf 48 h after infection; F: Light microscope observation of a leaf 96 h after infection. MC: Mycelial; IC: Infection cushion. Scale bar: 50 μm ; Magnification times: 400 \times .

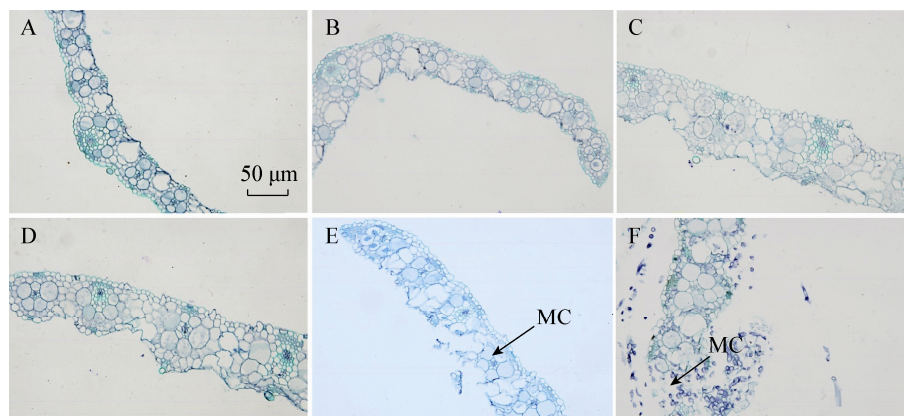


图5 结缕草叶片横切图

Figure 5 Microscopic observation of *Z. japonica* leaves cross section

注: 染色较深的是菌丝, 颜色较浅的是叶组织, 如图中箭头所示. A: 对照, 未侵染的叶片横切图; B-F: 立枯丝核菌侵染后 12、24、36、48、96 h 的叶片横切图. MC: 菌丝. 比例尺: 50 μm ; 放大倍数: 400 \times .

Note: The dark tissue was hyphae, and the light one was leaf tissue. A: Light microscope observation of a uninoculated *Z. japonica* leaf cross section; B: Light microscope observation of a leaf cross section 12 h after infection; C: Light microscope observation of a leaf cross section 24 h after infection; D: Light microscope observation of a leaf cross section 36 h after infection; E: Light microscope observation of a leaf cross section 48 h after infection; F: Light microscope observation of a leaf cross section 96 h after infection. MC: Mycelial. Scale bar: 50 μm . Magnification times: 400 \times .

表 3 立枯丝核菌对结缕草侵染过程
Table 3 The infection process of *Rhizoctonia solani* in *Zoysia japonica* steud.

时间 Time (h)	根 Roots			叶 Leaves		
	侵染过程 Infection process	定殖过程 Colonization process	宏观症状 Macro symptom	侵染过程 Infection process	定殖过程 Colonization process	宏观症状 Macro symptoms
0-9	菌丝在根表面处于游离状态	根组织细胞周围未见散落菌丝,根组织细胞保持完整	无症状	未见菌丝吸附于叶片	叶组织细胞保持完整	无症状
12	菌丝吸附于根表面	根组织周围散落少量菌丝,根组织细胞保持完整	无症状	未见菌丝吸附于叶片	叶组织细胞保持完整	无症状
24	类侵染垫结构的形成	菌丝侵入根组织细胞,根细胞保持完整	无症状	菌丝吸附于叶片	叶组织细胞保持完整	无症状
36	成熟的侵染垫的形成	菌丝存在于细胞间隙及细胞内,根细胞保持完整	无症状	少量菌丝吸附于叶片	叶组织细胞保持完整	基部第 1 片叶水渍状
48	菌丝侵染面积不断扩大,侵染程度加强	根表皮细胞周围菌丝量增加,侵染程度加强	无症状	叶片菌丝侵染面积增大	病害严重部分出现,组织细胞分离解体	基部第 2 片叶褪绿变黄,部分叶片褐变
96	菌丝侵染整个根部,叶组织细胞结构分离解体	大量菌丝聚集于根表皮细胞周围,菌丝侵染皮层细胞及除木质部导管侵染整个叶片以外的整个维管束系统	无症状	形成大量的侵染垫,侵染整个叶片	菌丝侵入叶组织细胞内,叶侵染程度组织细胞分离解体	全株枯死

3 结果与讨论

我国对草坪病害的研究相对较晚,对引起草地褐斑病的研究甚少^[17]。丝核菌属真菌引起的草坪褐斑病是我国林业植物检疫性病害,急需对其进行系统性研究。立枯丝核菌是引起草坪褐斑病的一种重要病原菌,主要以菌核或菌丝体的形式定殖于土壤有机质中,引起植物叶片、茎以及根腐等一系列病害症状^[18]。由立枯丝核菌引起的结缕草褐斑病是结缕草草坪的常见多发病害,对草坪造成严重危害^[8]。本研究对立枯丝核菌侵染结缕草的过程及其引发的病害症状进行系统研究。为避免其他病原微生物对立枯丝核菌 AG1 IA 侵染结缕草的影响,本研究在无菌的 MS 培养基上进行。为控制病原菌的接种量,将带有菌源的早熟禾种子接种至结缕草无菌苗

根部,建立立枯丝核菌 AG1 IA 与结缕草无菌苗的侵染关系。

光学显微镜及宏观观察立枯丝核菌侵染至结缕草发病全过程。AG1 IA 与结缕草根部落接触 0-9 h,以游离的菌丝形式在根表面生长(图 2A),叶片中未见菌丝(图 4A),根与叶组织细胞均保持完整(图 3A, 5A),结缕草正常生长,与对照保持一致(图 1A);侵染后 12 h,菌丝开始吸附于根表面,沿根表面定向生长,缠绕(图 2B),根组织周围散落着少量菌丝,根组织细胞保持完整(图 3B),叶片中仍未见菌丝(图 4B),叶组织细胞保持完整(图 5B),结缕草正常生长;侵染后 24 h,菌丝顶端开始出现分枝,相互缠绕,形成类侵染垫结构锥形(图 2C),经细胞间隙向根组织细胞内部扩展,根组织细胞内存在大量菌丝,根细胞仍保持完整结构(图 3C),叶片和叶组织

细胞中均未见菌丝, 结构保持完整(图 4C, 5C), 结缕草长势正常; 侵染后 36 h, 根表面的菌丝交叉形成较成熟的侵染垫, 扩大侵染(图 2D), 根皮层细胞、薄壁细胞及内皮层细胞及其间隙内均存在菌丝(图 3D), 叶组织被少量菌丝覆盖, 叶组织细胞基本保持完整, 未发现菌丝侵入(图 4D, 5D), 基部第一片叶出现水渍状(图 1B); 随着侵染时间的延长, 菌丝不断扩大侵染, 侵染程度不断加深, 菌丝扁平状紧紧吸附于根表面(图 2E、F), 大量菌丝聚集于根组织细胞周围进行侵染(图 3E、F), 菌丝大面积覆盖叶片, 形成大量的侵染结构对其再侵染(图 4E、F), 菌丝侵入叶组织内, 叶细胞分离降解, 细胞内容物褐化(图 5E、F), 叶片病害向上扩展, 逐渐加重, 叶片褐变、干枯, 病斑凹陷, 最终结缕草植株萎蔫死亡。结缕草根没有出现明显的根腐等症状。

立枯丝核菌 AG1 IA 侵染结缕草时, 菌丝先吸附于根表面, 随后大量的菌丝聚集于根表面, 形成类侵染垫结构进行侵染, 与立枯丝核菌 AG8 侵染拟南芥的过程相似^[12]。AG1 IA 以侵染垫或菌丝直接侵入细胞。侵染结构的形成可能是为穿透寄主时突破寄主物理障碍提供所需的机械压力。在不形成侵染结构的位点, 可能是角质层和表皮细胞较其他部位弱, 因而菌丝可直接侵入。侵染垫或菌丝侵入根部时, 侵染点位置的皮层细胞没有被破坏解体, 菌丝侵染至除维管束导管外的整个维管束系统, 根组织细胞仍保持其完整性, 与其他各种寄主病原菌互作相比^[19-20], AG1 IA 成功定殖于细胞内与寄主细胞壁的破坏无关。

AG1 IA 与结缕草根接触 12 h 开始吸附于根表面; 24 h 后形成类侵染垫, 菌丝侵入根组织内, 结缕草正常生长, 无病害症状, 病情指数为 0; 菌丝侵入 36 h 后结缕草基部叶片出现水渍状, 叶片上出现少量菌丝, 症状等级为 1 级, 病情指数升高, 与侵染后 0-30 h 相比, 病情指数差异不明显; 菌丝侵入 48 h 后出现 3 级症状, 病情指数显著升高; 随着侵染时间的延长, 结缕草病害程度逐渐升高, 病情指数呈显著性升高趋势。病原菌 AG1 IA 侵染后

36 h, 结缕草叶片出现病症, 病症部位见少量菌丝体, 叶组织细胞内无菌丝侵入, 组织细胞保持完整, 表明侵染初期结缕草叶片病变与菌丝直接侵染无直接联系, 可能是菌丝侵染结缕草过程中, 打破了植物体对外来病原菌的免疫平衡点, 自身免疫系统无法抑制菌丝生长, 植物受到一定的危害; 随着侵染时间的延长, 植物体自身免疫系统逐渐崩溃, 不足以抵抗病原菌的侵入, 病原菌侵染引起的病害随着病原菌在植物体内的分布与增殖而扩展; 侵染后 60 h, 菌丝沿植物表面进行扩展, 不断对植株叶片进行再侵染, 使病害严重程度日益加大, 直至植物体枯萎死亡。

病原菌由地下部开始侵入至寄主发病, 地上部和地下部组织对病原菌的侵染作出不同的寄主反应, 且随着侵染时间的延长, 叶片病害严重度逐渐上升, 根部无明显受害症状。该病原菌可能逃避寄主防御反应后成功侵入寄主体内, 进而调控寄主反应, 引起植物细胞死亡, 表明该病原菌侵染机制的复杂性, 并不是简单地通过产生细胞壁降解酶等相关蛋白及次级代谢产物造成组织浸渍及细胞壁降解直至整个细胞组织崩溃进行侵染。立枯丝核菌 AG1 IA 侵染初期, 可能产生各种分泌蛋白及各类效应子抑制寄主防御反应, 利于病原菌侵入植物体; 病原菌成功定殖后, 激活过敏反应(HR)及植物防御反应, 随后进一步表达编码降解相关酶的特定基因以破坏处于病原菌相关分子模式引起的免疫性反应(PHIs)状态的植物, 引起植物损伤。

近年来研究揭示了大量病原菌的效应子及其操纵寄主细胞的功能。腐生型病原真菌类蛋白质的效应子被报道^[21]。一些腐生型效应子受体充当显性疾病易感基因的研究已经比较清楚^[22]。关于对立枯丝核菌 AG1 IA 效应子的研究很少。本研究通过传统实验技术方法及常规宏观指标测定, 明确了立枯丝核菌 AG1 IA 对日本结缕草的侵染过程及其症状表现, 为进一步从分子水平研究立枯丝核菌侵染机制研究提供了良好的腐生植物互作模型。从分

子水平深入挖掘出调控寄主防御反应及引起植物细胞死亡的潜在效应子,是寻找结缕草自身对立枯丝核菌侵染特异免疫反应的突破口,以期为培育抗立枯丝核菌 AG1 IA 结缕草新品种提供方向。

参 考 文 献

- [1] He Q, Liu JX. Advances in fungi diseases research on Turfgrasses[J]. Pratacultural Science, 2006, 23(4): 95-104 (in Chinese)
何秋, 刘建秀. 草坪草真菌病害的研究进展[J]. 草业科学, 2006, 23(4): 95-104
- [2] Piper CV, Coe HS. *Rhizoctonia* in lawn and pastures[J]. Phytopathology, 1919, 78: 15-16
- [3] Shang HS, Wang FK. Turf Pest Identification and Prevention[M]. Beijing: Golden Shield Press, 2002 (in Chinese)
商鸿生, 王凤葵. 草坪病虫害识别与防治[M]. 北京: 金盾出版社, 2002
- [4] Burpee L, Martin B. Biology of *Rhizoctonia* species associated with turfgrasses[J]. Plant Disease, 1992, 76(2): 112-117
- [5] Smiley RW, Dernoeden PH, Clarke BB. Compendium of Turfgrass Diseases[M]. St Paul: The American Phytopathological Society Press, 2005
- [6] Ogoshi A. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn[J]. Phytopathology, 1987, 25(1): 125-143
- [7] Zarlengo PJ, Rothrock CS, King JW. Influence of shading on the response of tall fescue cultivars to *Rhizoctonia solani* AG1-IA[J]. Plant Disease, 1994, 78(2): 126-129
- [8] Cheng HB, Liu RT. The current situation and progress of research of brown patch in turfgrass[J]. Grassland and Turf, 2002(3): 10-15 (in Chinese)
陈海波, 刘荣堂. 草坪草褐斑病的研究进展和现状[J]. 草原与草坪, 2002(3): 10-15
- [9] Okubara PA, Dickman MB, Blechl AE, et al. Molecular and genetic aspects of controlling the soilborn necrotrophic pathogens *Rhizoctonia* and *Pythium*[J]. Plant Science, 2014, 228: 61-70
- [10] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture[J]. Plant Physiology, 1962, 15(3): 473-497
- [11] Dai XM, Cheng XX, Zeng HM, et al. The optimization of total RNA extraction and mRNA isolation from *Zoysia* grass (*Zoysia japonica*)[J]. Biotechnology Bulletin, 2010(12): 132-136 (in Chinese)
代小梅, 程晓霞, 曾会明, 等. 日本结缕草总 RNA 提取和 mRNA 分离方法的优化[J]. 生物技术通报, 2010(12): 132-136
- [12] Perl-Treves R, Foley RC, Chen W, et al. Early induction of the *Arabidopsis* *GSTF8* promoter by specific strains of the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*[J]. The American Phytopathological Society, 2004, 17(1): 70-80
- [13] Zhao CJ, Wang AR, Shi YJ, et al. Identification of defense-related genes in rice responding to challenge by *Rhizoctonia solani*[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2008, 116(4): 501-516
- [14] Su YQ, Peng F, Li B, et al. Improvement of paraffin section methods and morphological studies on *Usnea betulina*[J]. ACTA Botanica Boreali-occidentalia Sinica, 2007, 27(5): 859-863 (in Chinese)
苏印泉, 彭锋, 黎斌, 等. 桦树松萝的石蜡切片方法改良及形态学研究[J]. 西北植物学报, 2007, 27(5): 859-863
- [15] Fang ZD. Plant Disease Research Methods[M]. Beijing: Agriculture Press, 1982: 138 (in Chinese)
方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 农业出版社, 1982: 138
- [16] Jia CH. Biology and control of *rhizoctonia solani* in kentucky blugrass[C]. Beijing: China International Grass Industry Development Conference, 2002 (in Chinese)
贾春虹. 早熟禾褐斑病菌的生物学及防治研究[C]. 北京: 中国国际草业发展大会暨中国草原学会第六届代表大会, 2002
- [17] Zhang JZ, Shang HS. Identification of *rhizoctonia* species associated with Kentucky bluegrass and Tall fescue[J]. ACTA Prataculturæ Sinica, 2003, 12(4): 31-34 (in Chinese)
张敬泽, 商鸿生. 草地早熟禾和高羊茅病原丝核菌的物种鉴定[J]. 草业学报, 2003, 12(4): 31-34
- [18] González-García V, Portal-Onco MA, Rubio V. Biology and systematics of the form genus *Rhizoctonia*[J]. Span: Spanish Journal of Agricultural Research, 2006, 4: 55-79
- [19] Roncero MIG, Hera C, Ruiz-Rubio M, et al. *Fusarium* as a model for studying virulence in soilborne plant pathogens[J]. Physiological and Molecule Plant Pathology, 2003, 62(2): 87-98
- [20] Talbot NJ. On the trail of a cereal killer: exploring the biology of *Magnaporthe grisea*[J]. Annual Review Microbiology, 2003, 57: 177-202
- [21] Oliver RP, Solomon PS. New developments in pathogenicity and virulence of necrotrophs[J]. Current Opinon Plant Biology, 2010, 13(4): 415-419
- [22] Faris JD, Zhang Z, Lu H, et al. A unique wheat disease resistance-like gene governs effector-triggered susceptibility to necrotrophic pathogens[J]. Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(30): 13544-13549