

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2022)03-0228-08

DOI: 10.19918/j.cnki.1672-3635.2022.03.005

病虫害防治

黑龙江省马铃薯黑痣病菌融合群类型分析

杨 帅¹, 郭 梅^{1*}, 王文重¹, 魏 琪¹, 董学志¹, 毛彦芝¹, 闵凡祥¹, 王 玲²

(1. 黑龙江省农业科学院经济作物研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086; 2. 黑龙江省农业科学院耕作栽培研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘 要: 为明确黑龙江省马铃薯黑痣病菌融合群类型和分布情况, 采用ITS序列分析法分析了2012~2021年采自黑龙江省10个马铃薯种植区的482份马铃薯黑痣病菌株的融合群类型及频率分布。试验共鉴定出5种融合群, 其中344个菌株属于AG-3, 出现频率为71.37%; 70个菌株属于AG-5, 出现频率为14.52%; 32个菌株属于AG-2, 出现频率为6.64%; 34个菌株属于AG-4, 出现频率为7.05%; 2个菌株属于AG-1, 出现频率为0.42%。在AG-2和AG-4融合群中分别鉴定出AG-2-1、AG-2-2IIIB和AG-2-2IV以及AG-4-HGI和AG-4-HGII五个融合亚群, 出现频率依次为50.00%、6.25%、43.75%和70.59%、29.41%。结合黑龙江省马铃薯种植区域和融合群类型分析, 表明AG-3为优势致病融合群, 在全省马铃薯主产区均有分布, 同时也反映出黑龙江省马铃薯黑痣病菌融合群类型较为复杂。因此, 加强对黑痣病菌融合群类型变化的监测, 对更好地进行马铃薯黑痣病防控具有重要意义。

关键词: 马铃薯; 黑痣病; 立枯丝核菌; 融合群

Identity of the Anastomosis Group of Potato Black Scurf in Heilongjiang Province

YANG Shuai¹, GUO Mei^{1*}, WANG Wenzhong¹, WEI Qi¹, DONG Xuezhi¹, MAO Yanzhi¹, MIN Fanxiang¹, WANG Ling²

(1. Institute of Industrial Crop, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086, China;

2. Institute of Crop Cultivation and Tillage, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086, China)

Abstract: Four hundred and eighty-two samples of black scurf isolates collected from 10 different potato growing regions of Heilongjiang Province in 2012 to 2021 were detected by ITS sequence analysis method in order to clarify the type and distribution of anastomosis group of black scurf in Heilongjiang Province. Five anastomosis groups were identified, of which 344 isolates belong to AG-3, with a frequency of 71.37%; 70 isolates belong to AG-5, with a frequency of 14.52%; 32 isolates belong to AG-2, with a frequency of 6.64%; 34 isolates belong to AG-4, with a frequency of 7.05%; and two isolates belong to AG-1, with a frequency of 0.42%. In AG-2 and AG-4 anastomosis groups, five anastomosis subgroups, AG-2-1, AG-2-2IIIB and AG-2-2IV, and AG-4-HGI and AG-4-HGII, were identified, and the occurrence frequency was 50.00%, 6.25% and 43.75%, and 70.59% and 29.41%, respectively. Combining the potato planting regions and anastomosis group analysis, AG-3 was considered the dominant pathogenic anastomosis group,

收稿日期: 2022-06-15

基金项目: 黑龙江省自然科学基金优秀青年基金项目(YQ2019C022)。

作者简介: 杨帅(1982-), 男, 博士, 副研究员, 从事马铃薯病原检测及与寄主互作等相关研究。

*通信作者(Corresponding author): 郭梅, 研究员, 从事马铃薯真菌病害研究, E-mail: guo_plum@126.com。

which was distributed in the main potato producing regions of Heilongjiang Province. And it also reflects that the anastomosis group is relatively complex. Therefore, it is of great significance to strengthen the monitoring on the anastomosis group, which would be better for the control of black scurf.

Key Words: potato; black scurf; *Rhizoctonia solani*; anastomosis group

立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani* Kühn)是一种在全球范围内均有分布的土壤习居菌,其侵染寄主广泛、腐生能力强且土壤中存活时间长,被认为是极具破坏性的土传病原之一。该病原菌最早由法国人 Kühn 于 1858 年^[1]发现,此后美国、澳大利亚、南非等国也分别进行了报道。在中国最早的报道是在 20 世纪初期,但因当时危害并不严重而未引起人们的关注^[2]。在立枯丝核菌的研究方面,因其种内和种间存在着丰富的遗传多样性而被认定为是一个遗传差异较大的复合种。此后,以 Schultz^[3]提出的菌丝融合概念和 Parmeter 等^[4]提出的种内融合群分类法为基础,日本学者生越明^[5]建立的融合群分类法成为国际公认的分类标准。随着国内外学者研究的深入,目前国际公认的已知融合群类型已有 14 种,分别被命名为 AG-1~AG-13 及 AG-BI^[6,7]。此外,根据融合群内的融合频率、寄主范围、培养性状、致病性及生化和遗传特性等差异,一些融合群还可以进一步被划分为不同的亚群。如根据寄主的不同,AG-3 融合群还被分为 AG-3PT(马铃薯型)、AG-3TB(烟草型)和 AG-3TM(番茄型)^[8];而根据致病性,AG-1 可以被分为 IA、IB 和 IC 三个亚群。

马铃薯是中国的第四大粮食作物,具有耐旱、耐贫瘠、广适性强等优点。由立枯丝核菌引起的马铃薯溃疡病和黑痣病是马铃薯生产上极具威胁的一种土传病害^[9,10]。该病能在马铃薯生育期持续造成危害,如苗期危害幼芽引起生长点坏死从而导致气生块茎的产生;危害地下茎基部形成褐色梭型条斑导致地上部植株出现萎蔫等症状。同时其菌丝在薯块表皮还可以形成黑色菌核,造成马铃薯块茎表面出现裂口、粗皮、黑痣等症状,严重影响了种薯的品质和商品性,进而造成巨大经济损失^[11]。

黑龙江省地处中国东北部,不仅地理位置优

越而且兼具得天独厚的冷凉气候,是中国重要的马铃薯种薯及商品薯主产区之一^[12]。然而,近年来随着马铃薯产业的快速发展,由于缺乏轮作、种薯调运不当等原因,造成黑龙江省马铃薯黑痣病发生日趋严重,一般年份可达 10%~30%,重症地块发病率高达 70%~80%,严重影响了马铃薯的产量和品质^[13]。本研究采用分子生物学方法,系统分析了近十年来黑龙江省马铃薯主产区黑痣病菌融合群类型变化情况,以期更好地了解黑龙江省黑痣病菌融合群组成、分布及变化动态,进而为制定科学、精准的黑痣病防治策略提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试马铃薯黑痣病样品分别于 2012~2021 年采自黑龙江省 10 个马铃薯主产区的 21 个马铃薯种植区,具体见图 1。田间采集样品经常规组织分离法^[14]分离后,获得纯化立枯丝核菌菌株,经 PDA 平板活化后,移入试管 PDA 斜面,4℃保存、备用。

1.2 菌株基因组 DNA 的提取

黑痣病菌经分离、纯化后,采用商业化基因组 DNA 提取试剂盒提取总 DNA。提取 DNA 后利用微量分光光度计检测 DNA 纯度,取 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值在 1.8~2.0 的 DNA 用于后续 PCR 扩增试验。

1.3 融合群类型测定

根据 White 等^[15]报道的 ITS 序列分析法进行融合群测定。采用通用引物(ITS4 和 ITS5)对菌株样品的 ITS1-5.8S-ITS2 区段进行扩增,同时利用特异性引物 AG-2-1-F/R 和 Rs1F2/AG-3PR2 对 AG-2-1 和 AG-3PT 进行辅助验证^[16,17],引物见表 1。PCR 反应条件及体系按照康为世纪生物科技有限公司的 2x Es Taq MasterMix 产品说明书进行。扩增产物在 1.0% 琼脂糖凝胶中进行电泳后,利用凝



Figure 1 Geographical distribution of potato black scurf samples in Heilongjiang Province

Table 1 Primers for detection of anastomosis group

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

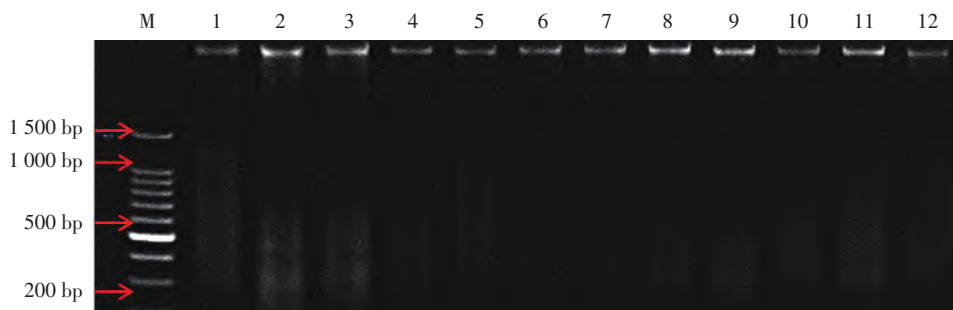
枯丝核菌样品完成分离纯化后, 采用商业化基因组 DNA 提取试剂盒提取每个样品的总 DNA, 并进行纯度检测。微量分光光度计检测结果表明, 所

提 DNA 样品的 OD_{260}/OD_{280} 比值均介于 1.8~2.0。电泳结果如图 2 所示, 均为单一条带, 可以用于后续试验。

表 2 2012~2021 年黑龙江省黑痣病菌样品采集信息

Table 2 Information of potato black scurf isolates collected from 2012 to 2021 in Heilongjiang Province

地市	地块	数量	品种	部位	采样时间
City	Location	Number	Variety	Source	Sampling year
哈尔滨 Harbin	呼兰祁堡村	13	尤金 885	块茎	2019~2021
	呼兰庆平村	2	克新 18 号	块茎	2013~2014
		3	荷兰 15	块茎/茎部	2013~2014
		19	尤金 885	块茎/茎部	2013~2021
	道外民主	34	尤金 885	块茎/茎部	2013~2021
		13	荷兰 15	块茎/茎部	2013~2019
		18	克新 13 号	块茎/茎部	2013~2017
	齐齐哈尔 Qiqihar	克山	11	荷兰 15	块茎/茎部
10			克新 1 号	茎部	2013
7			克新 13 号	块茎	2013
10			克新 18 号	块茎	2013
28			尤金	块茎	2019~2021
依安		8	克新 18 号	块茎	2013
		20	中薯 5 号	块茎	2019~2021
		龙江	12	克新 13 号	块茎/茎部
讷河		10	中薯 5 号	块茎	2020
绥化 Suihua		绥化	40	尤金 885	块茎
		9	克新 13 号	块茎	2013
		5	克新 19 号	块茎	2013
		肇东	11	荷兰 15	茎部
		15	克新 13 号	块茎/茎部	2012~2014
		18	尤金 885	块茎	2012
		绥棱	8	克新 13 号	块茎
	牡丹江 Mudanjiang	宁安拥军村	16	尤金 885	块茎
		8	克新 13 号	块茎	2013
		宁安东沟村	14	尤金 885	块茎
双鸭山 Shuangyashan	宝清	12	尤金 885	茎部	2013
佳木斯 Jiamusi	佳木斯	10	荷兰 15	茎部	2019~2021
		6	尤金 885	茎部	2019
富锦		15	克新 13 号	茎部	2013~2015
伊春 Yichun		铁力	19	荷兰 15	茎部
鹤岗 Hegang	鹤岗	14	尤金 885	块茎	2019~2021
		6	闽薯 1 号	块茎	2019~2021
黑河 Heihe	北安	8	尤金 885	块茎	2019~2021
		10	克新 13 号	茎部	2014
大兴安岭 Daxinganling	嫩江	4	未知	茎部	2014
	呼中	3	早大白	块茎	2012
		3	荷兰 15	块茎	2012
	加格达奇	10	尤金 885	茎部	2019~2021



注: M. DL 2 000 bp 分子量标准; 1~12. 部分样品的gDNA。

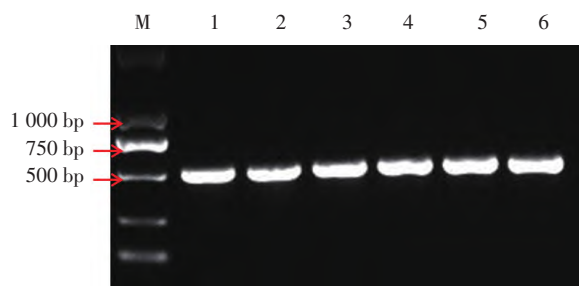
Note: M. DL 2 000 bp marker; 1-12. gDNA of partial samples.

图2 黑龙江省马铃薯黑痣病样品基因组DNA检测电泳图(部分样品)

Figure 2 gDNA extracted from potato black scurf isolates in Heilongjiang Province (partial samples)

利用ITS区通用引物进行融合群鉴定, 经PCR扩增后获得约700 bp的ITS1-5.8S-ITS2区域目的片段, 部分样品电泳见图3。经BLAST序列比对后, 482份菌株隶属5个融合群, 其中, 344个菌株属于AG-3, 出现频率为71.37%; 70个菌株属于AG-5, 出现频率为14.52%; 32个菌株属于AG-2, 出现频率为6.64%; 34个菌株属于AG-4, 出现频率为7.05%; 2个菌株属于AG-1, 出现频率为0.42%; 无其他融合群出现(表3)。其

中, AG-2融合群中包括AG-2-1、AG-2-2IIB和AG-2-2IV三个融合亚群, 出现频率分别为50.00%、6.25%和43.75%; AG-4融合群中只鉴定到AG-4-HGI和AG-4-HGII两个融合亚群类型, 出现频率分别为70.59%和29.41%, 未有AG-4-HGIII出现(表4)。同时, AG-2-1和AG-3PT经特异性引物AG-2-1-F/R和Rs1F2/AG-3PT进行辅助验证, PCR扩增分别可以获得480和474 bp阳性目的片段(图4)。



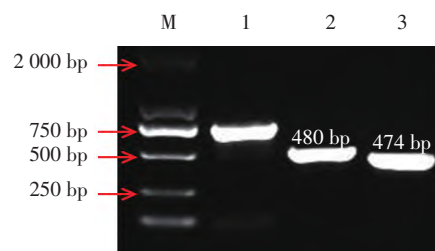
注: M. DL 2 000 bp 分子量标准; 1~6. 部分样品的PCR扩增产物。

Note: M. DL 2 000 bp marker; 1-6. PCR amplification products of partial samples.

图3 ITS引物扩增PCR产物凝胶电泳图(部分样品)

Figure 3 Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified by ITS primers (partial samples)

从黑龙江省马铃薯种植区域分布来看, 在全省10个马铃薯主产区AG-3融合群均有发生, 且



注: M. DL 2 000 bp 分子量标准; 1. ITS引物PCR扩增产物; 2. AG-2-1引物PCR扩增产物; 3. AG-3PT引物PCR扩增产物。

Note: M. DL 2 000 bp marker; 1. PCR amplification products with ITS primer; 2. PCR amplification products with AG-2-1 primer; and 3. PCR amplification products with AG-3PT primer.

图4 AG-2-1和AG-3PT特异性引物检测电泳图

Figure 4 Agarose gel electrophoresis of AG-2-1 and AG-3PT amplified by specific primers

所占比例均很高, 因此, AG-3是马铃薯致病立枯丝核菌的优势融合群。从致病融合群的丰富度来

看, 哈尔滨、齐齐哈尔、绥化3个地区的融合群类型较为丰富, 除了AG-3外, 还有AG-1、AG-2、AG-4和AG-5多种融合群, 说明黑龙江省西部地区的马铃薯黑痣病菌群体遗传多样性较为复

杂。与之相对比, 黑龙江省东部地区融合群类型相对单一, 其中牡丹江和黑河地区均有少量AG-5融合群发生, 佳木斯和鹤岗则偶有AG-2融合群出现, 其他地区仅有AG-3融合群(图5)。

表3 黑龙江省马铃薯立枯丝核菌融合群类型及分布

Table 3 Anastomosis group and distribution of *R. solani* isolates collected in Heilongjiang Province

城市 City	采样地点 Location	融合群 Anastomosis group					总数 Total
		AG-1	AG-2	AG-3	AG-4	AG-5	
哈尔滨 Harbin	呼兰庆平村	0	0	19	0	5	24
	呼兰祁堡村	0	0	13	0	0	13
	哈尔滨	1	3	46	5	10	65
齐齐哈尔 Qiqihar	克山	1	8	31	6	20	66
	依安	0	0	25	0	3	28
	龙江	0	0	6	0	6	12
	讷河	0	0	10	0	0	10
绥化 Suihua	绥化	0	0	38	9	7	54
	绥棱	0	0	8	0	0	8
	肇东	0	5	20	14	5	44
牡丹江 Mudanjiang	拥军村	0	0	18	0	6	24
	东沟村	0	0	14	0	0	14
双鸭山 Shuangyashan	宝清	0	0	12	0	0	12
佳木斯 Jiamusi	佳木斯	0	2	14	0	0	16
	富锦	0	0	15	0	0	15
伊春 Yichun	铁力	0	0	19	0	0	19
鹤岗 Hegang	鹤岗	0	14	6	0	0	20
黑河 Heihe	北安	0	0	8	0	4	12
	嫩江	0	0	6	0	4	10
大兴安岭 Daxinganling	加格达奇	0	0	10	0	0	10
	呼中	0	0	6	0	0	6
总计 Total		2	32	344	34	70	482
百分比 Percentage		0.42	6.64	71.37	7.05	14.52	100

表4 马铃薯立枯丝核菌AG-2和AG-4融合亚群的鉴定及分布

Table 4 Anastomosis subgroup and distribution of *R. solani* AG-2 and AG-4

采样地点 Location	AG-2			AG-4		
	AG-2-1	AG-2-2IIIB	AG-2-2IV	AG-4-HGI	AG-4-HGII	AG-4-HGIII
哈尔滨 Harbin	3	0	0	1	4	0
克山 Keshan	8	0	0	4	2	0
绥化 Suihua	0	0	0	9	0	0
肇东 Zhaodong	5	0	0	10	4	0
佳木斯 Jiamusi	0	2	0	0	0	0
鹤岗 Hegang	0	0	14	0	0	0
总计 Total	16	2	14	24	10	0
百分比 Percentage	50.00	6.25	43.75	70.59	29.41	0

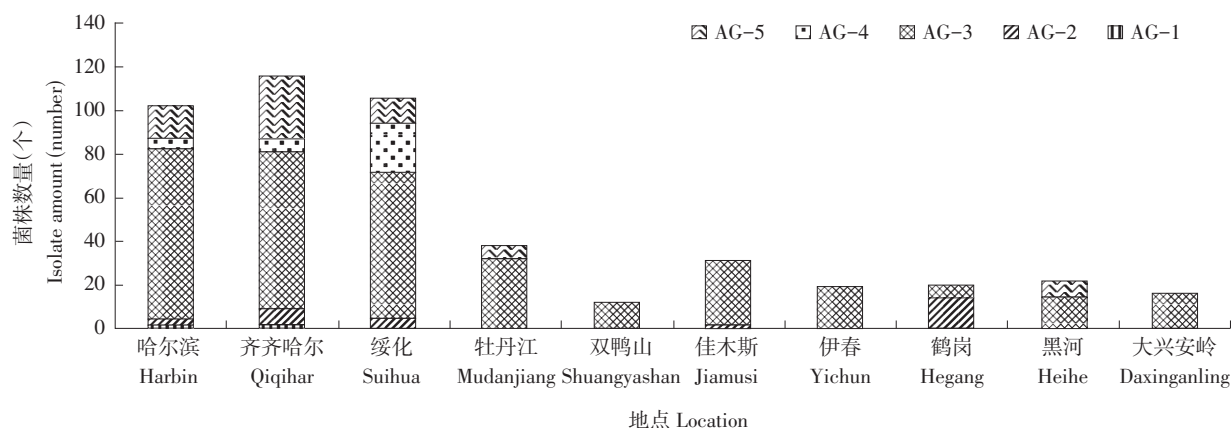


图5 黑龙江省马铃薯主产区黑痣病菌融合群类型组成及分布

Figure 5 Type and distribution of anastomosis group of black scurf isolates collected in main potato growing regions of Heilongjiang Province

3 讨论

鉴于立枯丝核菌种内及种间遗传多样性丰富, 因此该菌常被界定为一个遗传差异较大的复合种^[17]。自1936年Schultz^[3]首次提出立枯丝核菌菌丝融合群的概念后, 由日本学者生越明^[5]建立了得到国际公认的融合群鉴定方法。传统的菌丝融合群是将2个待测菌株进行对峙培养后, 利用光学显微镜观察菌丝的生长和交叠现象。由于菌丝融合法只能划分不同融合群, 但不能很好的反映其种内及种间的变异关系, 因此随着分子生物学的发展, 能够在分子水平上反映遗传变化的rDNA-ITS序列分析法, 成为研究立枯丝核菌遗传多样性的重要手段。

马铃薯黑痣病是马铃薯生产上最具威胁的土传病害之一。国内外研究均表明AG-3融合群是引起马铃薯黑痣病的优势融合群类型^[18]。黑龙江省作为中国东北部主要的种薯和商品薯生产基地, 近年来马铃薯黑痣病的发生呈逐年增加且日趋严重的趋势, 田间发病率在大发生年份可达70%以上。关于黑龙江省马铃薯黑痣病融合群的相关研究起步较晚, 其中田晓燕等^[19]、李晓妮等^[20]虽然均有关于黑龙江省黑痣病菌融合群类型的报道, 但由于样品数量和采集地点相对较少, 因此并不能很好的反映出黑龙江省的病原特点。本研究系

统梳理了10年来黑龙江省马铃薯黑痣病菌的融合群类型组成及分布情况, 综合样品数量、出现频率以及地域分布情况, 不仅充分说明了AG-3依然是黑龙江省马铃薯主产区优势致病融合群类型, 也清晰的反映出AG-5融合群已经和AG-4融合群一样成为了危害黑龙江省马铃薯的次优势菌群。同时, 本次调查还发现了AG-1-IB、AG-2-2IIIB、AG-2-2IV三个融合亚群, 这也是分别在黑龙江省的首次发现。此外, 在AG-4融合群中仅鉴定出AG-4-HGI和AG-4-HGII两个融合亚群, 未获得AG-4-HGIII, 这一结果与李晓妮等^[20]的研究结果相一致, 但Yang等^[21]在黑龙江省39份样品中分离出AG-4-HGIII, 说明黑龙江省马铃薯黑痣病菌融合群类型较为复杂, 融合群的丰富度与样品的来源密切相关。牟明等^[22]对黑龙江省马铃薯黑痣病融合群的鉴定中, 发现了AG-1-IA、AG-1-IC、AG-6、AG-8四个融合群类型, 也再次证明对不同区域马铃薯黑痣病菌融合群类型的监测十分必要。

[参 考 文 献]

- [1] Kühn J G. Die krankheiten der kulturgewächse: ihre ursachen und ihre verhütung [M]. Berlin: Gustav Bosselmann, 1858.
- [2] 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.
- [3] Schultz H. Vergleichende untersuchungen zur ökologie, morphologie und systematik des vermehrungspilzes [J]. Arb Biol Reichsanst Landund-u Forstwirtschaft, 1936, 22: 1–41.
- [4] Parmeter J R, Sherwood R T, Platt W D. Anastomosis grouping among isolates of *Thanatephorus cucumeris* [J]. Phytopathology, 1969, 59: 1270–1278.
- [5] 生越明. *Rhizoctonia solani* Kuhnの菌糸融合による類別と各群の完全時代にする研究 [J]. 農業技術研究所報告c病理・昆虫, 1976: 1–63.
- [6] Carling D E, Kuninaga S, Brainard K A. Hyphal anastomosis reactions, rDNA-internal transcribed spacer sequences, and virulence levels among sunsets of *Rhizoctonia solani* anastomosis group-2 and AG-BI [J]. Phytopathology, 2002, 92(1): 43–50.
- [7] Sharon M, Sneh B, Kuninaga S, *et al.* Classification of *Rhizoctonia* spp. using rDNA-ITS sequence analysis supports the genetic basis of the classical anastomosis grouping [J]. Mycoscience, 2008, 49(2): 93–114.
- [8] Bartz F E, Cubeta M A, Toda T, *et al.* An in planta method for assessing the role of *Basidiospores* in *Rhizoctonia* foliar disease of tomato [J]. Plant Disease, 2010, 94(5): 515–520.
- [9] Jeger M J, Hide G A, van den Boogert P H J F, *et al.* Soilborne fungal pathogens of potato [J]. Potato Research, 1996, 39(6): 437–469.
- [10] Banville G B, Carling D E. *Rhizoctonia* canker and black scurf [C]// Stevenson W R, Loria R, Franc G, *et al.* Compendium of potato diseases. St Paul, MN: APS Press, 2001: 36–37.
- [11] Tsrer L. Biology, epidemiology and management of *Rhizoctonia solani* on potato [J]. Journal of Phytopathology, 2010, 158 (10): 649–658.
- [12] 郑妍妍, 苏戈, 王红蕾, 等. 黑龙江省马铃薯产业发展优势、问题及对策 [J]. 黑龙江农业科学, 2021(4): 115–118.
- [13] 李磊, 陈利达, 黄艺烁, 等. 马铃薯黑痣病菌实时荧光定量PCR检测体系的建立及应用 [J]. 农业生物技术学报, 2021, 29(7): 1417–1425.
- [14] 曹春梅, 王晓娇, 许飞, 等. 内蒙古地区马铃薯黑痣病立枯丝核菌融合群及致病性研究 [J]. 中国马铃薯, 2018, 32(5): 293–302.
- [15] White T J, Bruns T, Lee S, *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [J]. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, 1990, 18(1): 315–322.
- [16] Woodhall J W, Lees A K, Edwards S G, *et al.* Characterization of *Rhizoctonia solani* from potato in Great Britain [J]. Plant Pathology, 2007, 56(2): 286–295.
- [17] Ceresini P C, Shew H D, Vilgalys R J, *et al.* Genetic diversity of *Rhizoctonia solani* AG-3 from potato and tobacco in North Carolina [J]. Mycologia, 2002, 94(3): 437–449.
- [18] 夏善勇, 牛志敏, 李庆全, 等. 马铃薯黑痣病立枯丝核菌及其综合防控研究进展 [J]. 江苏农业科学, 2022, 50(12): 28–34.
- [19] 田晓燕, 蒙美莲, 张笑宇, 等. 马铃薯黑痣病菌菌丝融合群的鉴定 [J]. 中国马铃薯, 2011, 25(5): 298–301.
- [20] 李晓妮, 徐娜娜, 于金凤. 中国北方马铃薯黑痣病立枯丝核菌的融合群鉴定 [J]. 菌物学报, 2014, 33(3): 584–593.
- [21] Yang Y G, Zhao C, Guo Z J, *et al.* Anastomosis group and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* associated with stem canker and black scurf of potato in China [J]. European Journal of Plant Pathology, 2015, 143(1): 99–111.
- [22] 牟明, 赵伟, 杨明秀, 等. 黑龙江马铃薯黑痣病菌生物学特性及菌丝融合群的鉴定 [J]. 中国瓜菜, 2017, 30(10): 12–17.