

文章编号:1003-8701(2015)05-0075-04

黑龙江省水稻立枯病病原鉴定及致病性研究

刘 烨,赵兴红,韩雨桐,张琳琳,张俊华*

(东北农业大学农学院,哈尔滨 150030)

摘 要:对分离自黑龙江省 16 个市县的 369 个水稻立枯病菌株进行了形态学和分子生物学鉴定,它们分别属于 3 个属 9 个种。致病性测定结果表明,尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)和轮枝镰刀菌(*Fusarium verticilloides*)的致病性相对较强,立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)其次;腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)、木贼镰刀菌(*Fusarium equiseti*)、燕麦镰刀菌(*Fusarium avenaceum*)、层出镰刀菌(*Fusarium proliferatum*)和腐霉菌(*Pythium spp.*)的致病性相对较弱;*Fusarium commune* 不具致病性,说明其只是一种腐生菌,不引起水稻的立枯病。结合分离出现频率和致病性测定结果,确定尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)和轮枝镰刀菌(*F. verticilloides*)为黑龙江省水稻立枯病的优势病原菌。

关键词:水稻立枯病;病原菌;鉴定;致病性

中图分类号:S435.111.4*9

文献标识码:A

Studies on Identification of Pathogen and Pathogenicity of Rice Seedling Blight in Heilongjiang Province

Liu Ye, Zhao Xing-hong, Han Yu-tong, Zhang Lin-lin, Zhang Jun-hua*

(College of Agronomy, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: 369 strains were isolated from the samples of rice seedling blight in 16 counties of Heilongjiang Province, which were divided into three genera and nine species through morphological observation and molecular detection. The results of pathogenicity test indicated that *Fusarium oxysporum* and *Fusarium verticilloides* showed stronger pathogenicity than others. The virulence of *Rhizoctonia solani* is weaker than *F. oxysporum* and *F. Verticilloides*, but stronger than that of *Fusarium solani*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium proliferatum* and *Pythium spp.* *Fusarium commune* has no pathogenicity to rice seedling, suggesting that it's just a kind of saprophytic pathogen. According to the occurrence frequency and the results of pathogenicity test, *F. oxysporum* and *F. verticilloides* were considered as the dominant pathogens of rice seedling blight in Heilongjiang Province.

Key words: Rice seedling blight; Pathogen; Identification; Pathogenicity

水稻是我国的主要粮食作物之一,在我国整个农业生产中占有重要的地位^[1]。黑龙江省是主要的水稻产区,种植面积逐年增加。近年来由于黑龙江省春季低温,加之大棚育秧、机插工厂化等种植方式和预防、管理措施不到位等原因,水

稻立枯病呈加重趋势,严重影响黑龙江省水稻的产量和品质^[2]。

2010~2012 年从黑龙江省 16 个市县的水稻产区采集水稻立枯病感病标样,分离获得 369 个立枯病菌株。通过对 369 个菌株进行分类鉴定及致病性测定研究,明确了黑龙江省水稻立枯病菌的种类和致病性情况,为黑龙江省水稻立枯病的防治奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 调查取样

于 2010~2012 年在黑龙江省尚志、庆安、密山、宁安、桦南、五常、鸡西、富锦、海林、富裕、杜

收稿日期:2015-04-08

基金项目:哈尔滨市科技攻关项目(2014AB6BN036);黑龙江省教育厅科学技术研究项目(11551041);博士后研究人员落户黑龙江科研启动资助项目(LBH-Q09172)

作者简介:刘 烨(1991-),女,在读硕士,主要从事寄主与病原物互作研究。

通讯作者:张俊华,男,教授,E-mail:podozjh@163.com

蒙、牡丹江、依安、方正、饶河、852农场等16个市县的水稻产区进行调查,选择典型症状的病株取样。

1.2 病原菌的分离及形态学鉴定

病原菌的分离采取常规组织分离法,挑取单菌落进行单孢分离和纯化。观察菌落培养性状及生长速度,通过 SNA 培养基培养,显微镜下观察菌株的产孢特征及各种孢子形态^[3-4](分别参照 Booth^[5]、Gerlach^[6]、Nelson^[7]、Brayford^[8]和 Leslie^[9]的分类系统及王拱辰^[10]的《常见镰刀菌鉴定指南》和陈鸿逵^[11]的《浙江镰刀菌志》对分离物进行微观形态学的鉴定)。

1.3 分子生物学鉴定

将形态学方法无法确定到种的菌株进行分子生物学鉴定。将经单孢分离纯化的菌株接种到PSA平板上,28℃培养7 d后收集菌丝。参照张艳菊等^[12]的方法采用SDS法提取和纯化菌株基因组DNA。

PCR 扩增:本试验采取真菌通用引物 EF-1H (5'-ATGGGTAAGGAAGACAAGAC-3'), EF-2T (5'-GGAAGTACCA GTGATCATGTT-3'); PCR 扩增采用如下反应体系:反应总体积为 50μL: 无菌 ddH₂O 37.5μL; 10×PCR buffer (Mg²⁺ plus) 5μL; 10 mmol/L dNTPs 4μL; Primer1 (20μmol/L) 1μL; Primer2 (20μmol/L) 1μL; 100 ng/μL DNA 模板 1μL; Taq 酶 (5U/μL) 0.5μL。扩增条件:先 94℃变性 3 min; 然后 94℃变性 40 s, 56℃退火 40 s, 72℃延伸 1 min, 共进行 35 个循环; 最终 72℃延伸 10 min, 放置在

4℃保温。PCR 扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,电泳条件为 150 V、250 mA、30 min,并用凝胶成像系统照相,将 PCR 产物送至上海生工进行 DNA 测序,将测序结果提交到 Gene Bank 中进行序列比对。

1.4 病原菌的致病性测定

精选水稻种子,表面消毒、催芽,浸泡于分离病菌的孢子悬浮液(1×10⁶个/mL)中 0.5 h,播入装有试验土(160℃干热灭菌 2 h)的钵中,每钵 10 粒,覆盖塑料薄膜以减少水分蒸发,待水稻苗 3 叶期时调查发病情况(采用王国珍等^[13]的 5 级分级标准)。根据柯赫氏法则,对发病植株进行再分离,显微镜下观察分离得到的病菌是否与原接种菌株相同。

2 结果与分析

2.1 病原菌形态学鉴定结果

从黑龙江省 16 个市县水稻产区采集的感病水稻秧苗中共分离到 369 个分离物,根据菌落的培养性状、生长速度及分生孢子形态特征等,分离物分属 3 个属 9 个种,分别为:镰刀菌属(*Fusarium*)的尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)、轮枝镰刀菌(*F. verticillioide*s)、腐皮镰刀菌(*F. solani*)、木贼镰刀菌(*F. equiseti*)、层出镰刀菌(*F. proliferatum*)、燕麦镰刀菌(*F. avenaceum*)、*F. commune*, 腐霉菌(*Pythium spp.*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)(表 1)。

表 1 分离的镰刀菌的形态特性鉴定

鉴定结果	典型的形态特征				
	大孢子	小孢子	菌落形态	产孢细胞	厚垣孢子
<i>F. oxysporum</i>	镰刀形, 2~4 隔, 基细胞足跟明显	大量, 卵圆形或肾形	白色, 背面产生淡紫色色素圈, 丝绒状	单瓶梗, 较短	球形, 顶生间生
<i>F. verticillioide</i> s	无	链状	白粉色至浅粉, 细绒毛状至粉末状	单瓶梗, 轮枝状分枝	无
<i>F. solani</i>	马特形, 2~8 隔	卵形或肾	白色至灰白色, 绒毛状	单瓶梗	圆球形, 单生串生对生
<i>F. equiseti</i>	抛物线形, 3~5 隔, 顶细胞足跟明显	无	白色至浅粉, 背面浅粉至蜜桃色, 长绒毛状	不规则分枝	球形, 后期变褐, 间生
<i>F. proliferatum</i>	无	链状, 无分隔, 假头生	粉色至淡紫, 背面紫色, 细粉状	单瓶梗或复瓶梗	无
<i>F. avenaceum</i>	细长型, 5~7 分隔, 产生于粘孢团上, 有足细胞	无	洋红色, 边缘白色, 中心黄棕色	单瓶梗或复瓶梗	无
<i>F. commune</i>	镰刀形, 0~5 隔	大量, 卵圆形或肾形	黄色或黄白色, 背面黄色至紫色色素圈, 长毛状	单瓶梗或复瓶梗	球形, 单生间生对生

2.2 病原菌分子生物学鉴定结果

2.2.1 镰刀菌的特异性片段扩增结果

对镰刀菌基因组 DNA 利用延伸因子 EF-1α 的引物 EF-2T 和 EF-1H 扩增后的序列片段大小

在690bp左右(图1)。

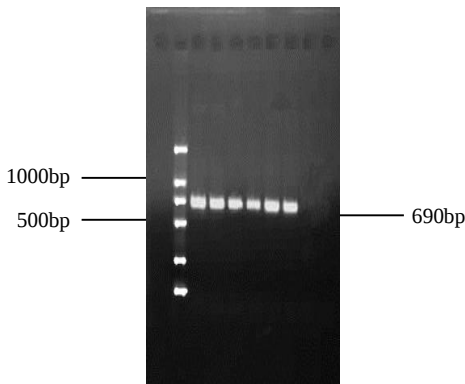


图1 镰刀菌DNA采用EF-1 α 扩增后产物

2.2.2 EF-1 α 基因PCR扩增产物的测序与比对结果

将扩增出的PCR产物送至上海生物工程公司进行DNA测序,将延伸因子EF-1 α 测序后的序列结果提交到Gene Bank中,比对结果见表2。

2.3 黑龙江省水稻立枯病原菌分离比例

从分离结果可以看出,不同地区的水稻立枯病原菌的优势种不尽相同,如海林地区的水稻立枯病原菌主要为腐皮镰刀菌和轮枝镰刀菌,而尚志地区只分离到了尖孢镰刀菌和轮枝镰刀菌,但从整个黑龙江省来看,轮枝镰刀菌与尖孢镰刀菌的分离频率较高,分别占总分离株数的37.40%和32.25%,详细结果见表3。

表2 所测菌株序列与基因库中现有序列比较结果

菌株编码	所测序列	碱基数(bp)	相似性(%)	镰刀菌种名
HN4(1)	EF-1 α	677	100	<i>F. oxysporum</i>
HN3(1)	EF-1 α	672	99	<i>F. oxysporum</i>
MS1(6)	EF-1 α	716	99	<i>F. solani</i>
SZ3(1)	EF-1 α	689	99	<i>F. oxysporum</i>
HN1黄(2)	EF-1 α	685	99	<i>F. commune</i>
HL1(1)	EF-1 α	693	100	<i>F. commune</i>

表3 黑龙江省16个市县水稻立枯病原菌分离结果

采集地区	分离频率(%)								
	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. avenaceum</i>	<i>F. equiseti</i>	<i>F. solani</i>	<i>F. commune</i>	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>R. solani</i>	<i>P. spp.</i>
海林	12.00	0	16.00	32.00	8.00	32.00	0	0	0
尚志	37.50	0	0	0	0	62.50	0	0	0
庆安	41.67	0	0	0	8.33	50.00	0	0	0
密山	19.35	0	0	9.68	0	51.61	3.23	16.13	0
桦南	34.38	0	15.62	0	25.00	25.00	0	0	0
富锦	35.71	0	7.14	0	14.29	35.72	0	0	7.14
五常	17.65	11.76	17.65	14.71	0	32.35	0	5.88	0
852农场	38.88	0	0	16.67	5.56	22.22	0	16.67	0
宁安	27.78	11.11	0	27.78	0	27.78	5.55	0	0
富裕	48.39	3.22	0	0	0	48.39	0	0	0
杜蒙	32.14	0	0	10.72	0	50.00	0	0	7.14
牡丹江	50.00	0	0	13.64	0	18.18	18.18	0	0
依安	30.00	0	25.00	0	0	45.00	0	0	0
方正	22.23	8.33	13.89	0	0	44.44	8.33	0	2.78
饶河	60.00	0	0	0	0	35.00	0	5.00	0
鸡西	35.00	0	25.00	0	0	25.00	0	10.00	5.00
总计	32.25	2.71	8.40	8.13	3.79	37.40	2.44	3.52	1.36

2.4 病原菌致病性测定

回接结果表明,尖孢镰刀菌和轮枝镰刀菌的致病性相对较高,病情指数分别达到了37.37和34.11,为黑龙江省水稻立枯病的主要致病菌。立

枯丝核菌致病性仅次于尖孢镰刀菌和轮枝镰刀菌;腐皮镰刀菌、木贼镰刀菌、燕麦镰刀菌和层出镰刀菌的致病性相对较弱,而*F. commune*不具有致病性,表明其为腐生菌(表4)。

表 4 黑龙江省水稻立枯病病原菌致病性比较

病原菌	回接株数	感病株数	致病率(%)	病情指数	再分离株数	再分离频率(%)
<i>F. oxysporum</i>	50	46	92.0	37.37	46	92.0
<i>F. verticillioides</i>	50	45	90.0	34.11	45	90.0
<i>Rhizoctonia solani</i>	50	39	78.0	28.79	39	78.0
<i>F. solani</i>	50	34	68.0	17.42	34	68.0
<i>F. equiseti</i>	50	31	62.0	16.81	30	60.0
<i>Pythium spp.</i>	50	27	54.0	13.37	26	52.0
<i>F. avenaceum</i>	50	25	50.0	10.88	25	50.0
<i>F. proliferatum</i>	50	23	46.0	5.42	21	42.0
<i>F. commune</i>	50	0	0	0	0	0

3 结论与讨论

对黑龙江省 16 个市县的水稻立枯病病原菌分离可以看出,不同地区的水稻立枯病病原菌的优势种不尽相同,但就整个黑龙江省来说,水稻立枯病病原分离物主要为尖孢镰刀菌和轮枝镰刀菌。致病性测定表明,尖孢镰刀菌、轮枝镰刀菌、腐皮镰刀菌、木贼镰刀菌、燕麦镰刀菌、层出镰刀菌、立枯丝核菌和腐霉菌均回接成功引起水稻立枯病,其中尖孢镰刀菌和轮枝镰刀菌致病性较强,而 *F. commune* 不具有致病性。结合分离和致病性测定结果,确定尖孢镰刀菌和轮枝镰刀菌为黑龙江省水稻立枯病的主要致病菌。

黑龙江省水稻立枯病的研究较少,只有 2001 年郑雯等^[2]分离了密山市的水稻幼苗立枯病病原。本试验结果与郑雯等试验结果部分相似,都分离到了尖孢镰刀菌、腐皮镰刀菌、木贼镰刀菌和立枯丝核菌,但没有分离到禾谷镰刀菌(*F. graminearum*)、半裸镰刀菌(*F. semitectum*),这可能与采集地的土壤类型、采集的年份、分离方法和采集样本的数量有关。本试验分离到的轮枝镰刀菌、层出镰刀菌、燕麦镰刀菌和腐霉菌引起水稻立枯病为黑龙江省首次报道。

F. commune 为黑龙江省首次分离到,目前没有查找到关于 *F. commune* 中文名称的描述。在形态学上 *F. commune* 与尖孢镰刀菌极其相似,二者很难区分开。*F. commune* 在黑暗条件下培养时有细而长的单瓶梗和复瓶梗产生,而尖孢镰刀菌只产生单瓶梗。持续的紫外灯照射下 *F. commune* 会产生 5 个隔的分生孢子(52-56 ~ 60-64) $\mu\text{m} \times (3.8-3.9 \sim 4.6-5.0) \mu\text{m}$,而尖孢镰刀菌多为 2 ~ 4 隔。

林佩力等^[14]研究认为引起水稻立枯病的病原为镰刀菌(*Fusarium*)、腐霉菌(*Pythium*)、丝核菌

(*Rhizoctonia*),其中镰刀菌(*Fusarium*)为主要病原菌;而华致甫^[15]则认为丝核菌(*Rhizoctonia*)为主要病原菌,其次为镰刀菌(*Fusarium*),前者致病力远高于后者。王国珍等^[13]研究了宁夏地区的水稻立枯病病原菌,其致病力强弱依次为镰刀菌(*Fusarium*)、腐霉菌(*Pythium*)、丝核菌(*Rhizoctonia*)。本试验中分离到了镰刀菌(*Fusarium*)、丝核菌(*Rhizoctonia*)、腐霉菌(*Pythium*),致病性测定结果表明,尖孢镰刀菌和轮枝镰刀菌致病性强于立枯丝核菌,腐霉菌致病性最弱。此结果与前人报道不尽相同,说明不同省份、不同地区水稻立枯病病原菌的致病性强弱不同。这可能与采集地区的土壤类型、气候条件有关。另外,水稻育秧期间的栽培技术和生育环境的变化以及当年的环境条件等都会对病原菌的种类和致病性产生重要的影响。

参考文献:

[1] 魏 光. 土壤施用氧化钙防治水稻旱育秧立枯病作用及对育秧质量的影响[D]. 泰安:山东农业大学,2007 .

[2] 郑 雯,台莲梅,王桂海,等. 黑龙江东部稻区水稻立枯病病原真菌的分离鉴定[J]. 黑龙江八一农垦大学学报,2001, 13(4):21- 23 .

[3] 周而勋,杨 媚. 从植物病组织中分离立枯丝核菌的快速、简便技术[J]. 华南农业大学学报,1998, 19(1):125-126 .

[4] Sneh B, Burpee L, Ogoshi A. Identification of *Rhizoctonia* species[M]. St. Paul . MN: APS Press, 1991: 31-34 .

[5] Booth. The Genus *Fusarium*[J]. Common wealth Mycological Institute, 1971, 12(3): 1-6 .

[6] Gerlach W, H I Nirenberg. The genus *Fusarium* a pictorial atlas [M]. Berlin-Dahlem: Mitt Biol Bund Land-Forst, 1982: 1-406 .

[7] Nelson, T A Toussoun. *Fusarium species* from corn, sorghum and soybean fields in the central and eastern United States[J]. Phytopathology, 1990(80): 343- 350 .

[8] Brayford. The Identification of *Fusarium species*[M]. Egham UK: International Mycological Institute, 1993: 1-119 .

[9] Leslie J F, B A Summerell. The *Fusarium* laboratory manual[M]. Iowa, USA: Blackwell Publishing, 2006: 1-388 .

(下转第 84 页)

- 研究进展[J]. 2004, 26(2): 87-90.
- [32] 孙富余, 赵成德, 田春晖, 等. 稻水象甲的发生规律与防治研究 VIII. 稻水象甲综合防治技术[J]. 辽宁农业科学, 1997(6): 7-10.
- [33] Hamm J C, Stout M J, Riggio R M. Herbivore and Elicitor Induced Resistance in Rice to the Rice Water Weevil(*Lissorhoptrus oryzophilus* Kuschel) in the Laboratory and Field[J]. J Chem Ecol, 2010, 36(2): 192-199.
- [34] 凌云, 肖铁光, 周社文, 等. 稻水象甲生物学及药剂防治初步研究[J]. 作物研究, 2009(23): 81-83.
- [35] 李晶津. 昆虫病原线虫防治稻水象甲成虫的室内测定[J]. 中国生物防治, 2007, 23(2): 188-190.
- [36] 韩日畴. 昆虫病原斯氏和异小杆线虫人工大量培养的研究概况[J]. 昆虫天敌, 1993, 15(4): 183-193.
- [37] 孙文鹏, 丛 斌, 董 辉, 等. 昆虫病原线虫防治稻水象甲幼虫的研究[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(8): 1620-1621.
- [38] Yozhizawa E. Microbial control of the rice water weevil with entomogenous fungi[A]. In: Establishment, spread and Management of the Rice Water Weevil and aliratory Rice Pests in East Asia[C]. Nare, Tsukuba, 1993: 265-274.
- [39] 柴一秋, 陈祝安, 冯惠英, 等. 金龟子绿僵菌对稻水象甲的致病性[J]. 中国生物防治, 2000, 16(1): 22-25.
- [40] 陈祝安, 冯惠英, 施立聪, 等. 田间施放绿僵菌防治稻水象甲效果评价[J]. 中国生物防治, 2000, 16(2): 53-55.
- [41] 于凤泉, 田春晖, 李志强, 等. 绿僵菌对稻水象甲的田间防治效果研究[J]. 辽宁农业科学, 2008(6): 5-8.
- [42] 张玉江, 张汉友. 白僵菌防治稻水象甲田间试验[J]. 河北农垦科技, 1997(4): 25-44.
- [43] 蒋明星, 高哈武, 程家安. 球孢白僵菌对稻水象甲成虫的毒力测定[J]. 植物保护学报, 2002, 29(3): 287-288.
- [44] 徐 进, 杨茂发, 杨大星, 等. 不同球孢白僵菌对稻水象甲成虫的致病力测定[J]. 贵州农业科学, 2013, 41(3): 69-72.

(责任编辑:姜晓莉)

(上接第74页)

- [4] 凤 桐, 高华援, 赵叶明, 等. 吉林省花生生产现状与发展优势[J]. 吉林农业科学, 2010, 35(1): 23-25, 27.
- [5] 孙 峥, 周紫阳, 陈永年, 等. 吉林省花生生产存在的问题与发展对策[J]. 吉林农业科学, 2013, 38(5): 15-17, 28.
- [6] 陈 凯, 谢宏峰, 樊堂群, 等. 80%代森锌可湿性粉剂防治花生叶斑病的效果[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(18): 10932-10933.
- [7] 王才斌, 郑亚萍, 成 波, 等. 花生超高产群体特征和光能利用研究[J]. 华北农学报, 2004, 19(2): 40-43.
- [8] 王才斌, 孙彦浩, 陶寿祥, 等. 高产花生叶面积消长规律及其与荚果产量的关系研究[J]. 花生科技, 1992(3): 8-12.
- [9] 郑亚萍, 田云云, 沙继锋, 等. 花生生产潜力与高产途径[J]. 花生学报, 2002, 31(1): 26-29.
- [10] 杨富军, 王铭伦, 赵长星, 等. 栽培方式对夏直播花生叶片光合特性及产量的影响[J]. 应用生态学报, 2013, 24(3): 747-752.
- [11] 杨富军, 高华援, 赵叶明, 等. 地膜覆盖栽培对花生生殖生长及产量的影响[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(26): 10643-10645.
- [12] 赵叶明, 王庆峰, 高华援, 等. 吉林省花生不同种植方式评价分析[J]. 吉林农业科学, 2011, 36(2): 11-12.

(责任编辑:王 昱)

(上接第78页)

- [10] 王拱辰, 郑 重, 叶琪明, 等. 常见镰刀菌鉴定指南[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1996: 12-21.
- [11] 陈鸿逵. 浙江镰刀菌志[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1992: 8-41.
- [12] 张艳菊, 陈 霞, 刘 东, 等. 黄瓜枯萎病菌遗传多样性的 AFLP分析[J]. 植物病理学报, 2011, 41(3): 301-304.
- [13] 王国珍, 蒋细良, 沙月霞, 等. 宁夏水稻旱育秧立枯病原菌的初步研究[J]. 西北农业学报, 2009, 18(1): 184-187.
- [14] 林佩力, 李 涌, 李 静, 等. 恶菌灵防治水稻立枯病研究[J]. 黑龙江农业科学, 1991(2): 1-5.
- [15] 华致甫, 丁晓民, 李 真, 等. 土菌消防治水稻立枯病[J]. 吉林农业大学学报, 1989, 11(3): 19-23.

(责任编辑:姜晓莉)