

东北三省禾谷类作物真菌分离鉴定及污染率调查

张铨哲¹, 李微¹, 郝璐¹, 侯思宇¹, 李宝刚²

(1. 东北农业大学农学院, 哈尔滨 150030; 2. 沈阳科创化学品有限公司, 沈阳 110161)

摘要:为明确东北三省谷物类病害的病原菌种类及污染概况, 本研究于2012年在黑龙江、吉林、辽宁三省15个禾谷类作物主产区进行抽查取样。污染率调查结果显示, 黑龙江省采集的水稻、玉米和小麦的污染率分别为29.20%、7.50%和57.50%; 吉林省采集的水稻和玉米的污染率分别为39.30%和9.40%; 辽宁省采集的水稻、玉米和小麦的污染率分别为3.75%、17.50%和20.00%。从东北三省采集的26份样品中共获得254株病原真菌, 通过形态学鉴定共分离到6种属的病原菌, 分别为镰孢菌属、链格孢菌属、根霉属、曲霉属、平脐蠕孢属和枝孢属。它们的分离频率分别为20.58%、1.25%、2.21%、0.10%、0.20%和0.10%。其中以镰孢菌属的分离频率最高, 为优势菌种。

关键词: 镰孢菌属; 鉴定; 污染率; 分离频率

中图分类号: S435.1

文献标识码: A

文章编号: 1003-8701(2016)01-0068-05

Isolation and identification of Fungus among the Cereal Crops in Northeastern Three Provinces and Investigation of Contamination Rate

ZHANG Xuanzhe¹, LI Wei¹, HAO Lu¹, HOU Siyu¹, LI Baogang²

(1. College of Agronomy, Northeast Agricultural University, Harbin 150030;

2. Shenyang Kechuang Chemical Co, Ltd. Shenyang 110161, China)

Abstract: Samplings from 15 main production areas of cereal crops from Heilongjiang, Jilin and Liaoning provinces were collected in 2012 to know the pathogen kinds and contamination rate. The results showed that contamination rate of rice, corn and wheat collected from Heilongjiang Province were 29.20%, 7.50% and 57.50%, respectively. The contamination rate of rice and corn collected from Jilin Province were 39.30% and 9.40%, respectively. The contamination rate of rice, corn and wheat collected from Liaoning Province were 3.75%, 17.50% and 20.00%, respectively. 254 strains were isolated from 26 samples of rice, wheat and corn in the three northeast provinces. Finally, six species were found, including *Fusarium spp.*, *Alternaria solani*, *Rhizopus spp.*, *Aspergillus spp.*, *Bipolaris spp.*, and *Cladosporium spp.* The isolation frequency of *Fusarium spp.*, *Alternaria spp.*, *Rhizopus spp.*, *Aspergillus spp.*, *Bipolaris spp.*, and *Cladosporium spp.* were 20.58%, 1.25%, 2.21%, 0.10%, 0.20% and 0.10%, respectively. Of which, the isolation frequency of *Fusarium* species was highest, and *Fusarium spp.* was the dominant group.

Key words: *Fusarium* species; Identification; Contamination rate; Isolation frequency

镰孢菌属(*Fusarium species*)为真菌界一个重要类群, 在各种不同环境中均可广泛存在, 被归类为人类发现的重要的植物病原真菌之一。粉红镰孢菌是最先被认知的镰孢菌, 由Link于1809年首次发现, 距今已有300多年历史^[1]。从19世纪90年代以来, 人们发现的镰孢菌属种类越来越多, 随着先进检测仪器的使用, 至今为止已有50

多个种和变种以及101个小种转化型被人们所认识^[2]。由于镰孢菌菌种间差别较微小, 形态复杂, 且容易受到外部条件的影响, 这为其鉴定工作带来很大难度。一直以来镰孢菌属被公认为是最难鉴定的真菌类群菌属之一^[3-4]。镰孢菌属中许多真菌可直接侵染动植物从而引发多种病害, 例如镰孢菌侵染植物后可破坏其输导组织维管束, 植物表现出萎蔫、腐烂、徒长等不同受害症状^[5]。以危害禾本科植物最为普遍, 在植物的穗茎部和根部发病, 一般情况下根据不同病原菌及发病严重程度表现出不同症状, 如疮痂、根腐、茎腐病、穗

收稿日期: 2015-06-26

基金项目: 哈尔滨市科技攻关计划项目(2011AA613BN072-1)

作者简介: 张铨哲(1970-), 男, 教授, 博士, 硕士生导师, 研究方向为真菌病害的综合防治。

腐、枯萎等。典型的病害为水稻恶苗病、玉米穗茎腐病、小麦赤霉病,它们是世界公认的最重要的植物病原真菌病害^[6]。

近年来随着气候变暖,禾谷类作物特别是在水稻、小麦和玉米上,病害流行频率逐年升高,发生程度逐年增加。镰孢菌属真菌作为诱发东北三省禾谷类作物穗腐病的主要致病菌群之一,在作物生长和粮食储藏过程中均造成较大危害,受害严重年份甚至会绝产,造成无法估量的经济损失。由于镰孢菌属在形态上变异性强、特征丰富,同时又缺少较为统一的分类体系,又由于禾谷类作物通常是由多种病原菌复合侵染,因此给镰孢菌属分类和鉴定工作带来诸多不便。有时作物受镰孢菌侵染后,在特定条件下表面并不会产生肉眼可见的症状。本研究通过对东北地区禾谷类真菌分离鉴定、分子生物学鉴定及污染率调查,旨在为该病害种的鉴定、毒素研究、综合防治提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 采集病样及分离病原菌

2012年在东北三省13个县市的水稻、小麦、玉米主产区进行病样的采集。选择具有典型症状的罹病穗,分装于保鲜袋中带回实验室分离研究。分离培养采用马铃薯蔗糖琼脂培养基PSA,获得菌落后,挑取菌丝在显微镜下镜检,将获得的镰孢菌菌落进行纯化培养,再经单孢分离得到纯化菌株。将病菌放于PSA和PDA培养基上进行培养,根据菌株性状进行形态学鉴定,出现频率高的确定为优势菌株。

1.2 镰孢菌鉴定

1.2.1 形态学鉴定

参照Nelson^[7]、Booth^[5]等的分类系统。(1)在PSA培养基上恒温培养5d后,十字交叉法测量所得

菌落生长直径,计算生长速度;(2)观察气生菌丝的颜色和形状类型;(3)在显微镜下观察大、小型分生孢子、厚垣孢子的有无以及测量其大小和宽度,分生孢子座和菌核生长情况,产孢细胞形状等。

1.2.2 分子生物学鉴定

在通过形态学鉴定的基础之上,放置于PDA中培养,7d后收集菌丝体。提取与纯化基因组DNA采用Goodwin等^[8]的方法。所用的引物为真菌通用引物,由上海生工合成,序列为:ITS1 5'-CGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAAC-3',ITS2 5'-TTATTGATATGCTT AAAC TCAGCGGG-3'。50 μL体系来PCR扩增。扩增得到的产物由上海生工测序,测序结果与Gene Bank中进行同源序列(BLAST)的比对,最终明确分离所得菌株与数据库中现存的已知菌之间的相似程度。

1.3 污染率调查

按病样分离方法对采集到的26份谷物类样品进行分离培养,从每份样品中随机选出40粒样品,每份样品一个PDA培养基中放8粒,5次重复。放在25℃恒温培养2~3d,分离样品接种在平板中。于25℃条件下放置培养,镜检所得菌株,计算污染率。

2 结果与分析

2.1 样品病原菌的分离鉴定

从东北三省采集的26份样本中共分离到6个属的病原菌254株,包括镰孢菌属、链格孢菌属、根霉属、曲霉属、平脐蠕孢属和枝孢属。分离频率为镰孢菌属(*Fusarium spp.*)20.58%、根霉属(*Rhizopus spp.*)2.21%、链格孢属(*Alternaria spp.*)1.25%、平脐蠕孢属(*Bipolaris spp.*)0.20%、曲霉属(*Aspergillus spp.*)0.10%、枝孢属(*Cladosporium spp.*)0.10%。以上结果显示东北三省引起穗腐病的主要病原菌为镰孢菌属(表1)。

表1 采集于不同地区的谷物分离到的病原菌调查

样品编号	采集地点	寄主植物	总谷粒数	未发病的谷粒和百分比(%)	由不同病原菌引起的发病谷粒数及分离频率(%)						
					镰孢菌	链格孢属	根霉属	曲霉属	平脐蠕孢属	枝孢属	
R-150700-1	哈尔滨	水稻	40	28(70.0)	12(30.0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
R-150700-2	哈尔滨	水稻	40	30(75.0)	8(20.0)	1(2.5)	0(0)	1(2.5)	0(0)	0(0)	0(0)
R-135311-1	通化	水稻	40	25(62.5)	15(37.5)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
R-135321-1	通化	水稻	40	30(75.0)	10(25.0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
R-135321-2	通化	水稻	40	28(70.0)	11(27.5)	1(2.5)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
R-135002-1	通化	水稻	40	30(75.0)	9(22.5)	1(2.5)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)

续表 1

样品编号	采集地点	寄主植物	总谷粒数	未发病的谷粒的百分比 (%)	由不同病原菌引起的发病谷粒数及分离频率 (%)					
					镰孢菌	链格孢属	根霉属	曲霉属	平脐蠕孢属	枝孢属
R-130699-1	长春	水稻	40	21(52.5)	17(47.5)	2(5.0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
R-130599-1	长春	水稻	40	27(67.5)	12(30.0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(2.5)	0(0)
R-130317-1	长春	小麦	40	9(22.5)	28(70.0)	3(7.5)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
R-152499-1	绥化	水稻	40	27(67.5)	12(30.0)	1(2.5)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
W-164145-1	黑河	小麦	40	8(20.0)	30(75.0)	1(2.5)	0(0)	0(0)	0(0)	1(2.5)
W-164135-1	五大连池	小麦克旱	40	26(65.0)	13(32.5)	0(0)	0(0)	0(0)	1(2.5)	0(0)
C-130317-3	沈阳	玉米	40	40(100.0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
C-130507-3	沈阳	水稻	40	40(100.0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
C-130607-1	鞍山	水稻	40	37(92.5)	3(7.5)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
C-130299-2	鞍山	玉米新农丰 2	40	32(80.0)	8(20.0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
C-132328-1	吉林市	玉米(309)	40	39(97.5)	0(0)	0(0)	1(2.5)	0(0)	0(0)	0(0)
C-135319-1	丹东	玉米(355)	40	20(50.0)	18(45.0)	0(0)	2(5)	0(0)	0(0)	0(0)
C-135306-1	丹东	玉米	40	40(100.0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
C-134101-1	辽阳	小麦	40	32(80.0)	0(0)	1(2.5)	7(17.5)	0(0)	0(0)	0(0)
C-133606-1	延边州	玉米	40	40(100.0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
C-138001-1	松原	玉米	40	32(80.0)	0(0)	1(2.5)	7(17.5)	0(0)	0(0)	0(0)
C-131213-2	松原	玉米吉农 212	40	34(85.0)	5(12.5)	0(0)	1(2.5)	0(0)	0(0)	0(0)
C-161021-1	齐齐哈尔	玉米	40	39(97.5)	0(0)	1(2.5)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
C-152499-1	绥化	玉米	40	37(92.5)	0(0)	0(0)	3(7.5)	0(0)	0(0)	0(0)
C-150112-1	双城五家	玉米	40	35(87.5)	3(7.5)	0(0)	2(5.0)	0(0)	0(0)	0(0)
总分离数量					214	13	23	1	2	1
频率 (%)					(20.58)	(1.25)	(2.21)	(0.10)	(0.20)	(0.10)

本研究从东北地区不同禾谷类主产区的水稻、小麦、玉米 26 份样品中共分离到 214 株镰孢菌,分属于 6 个属,其中包括腐皮镰孢 (*Fusarium solani*) 2 株、禾谷镰孢 (*Fusarium graminearum*) 108 株、轮枝镰孢 (*Fusarium verticillioides*) 30 株、胶孢

镰孢 (*Fusarium subglutinans*) 4 株、尖孢镰孢 (*Fusarium oxysporum*) 45 株、层生镰孢 (*Fusarium proliferatum*) 25 株。分离频率依次为 0.93%、50.48%、14.02%、1.87%、21.02%、11.68% (表 2)。

表 2 不同寄主植物上 6 种镰孢菌的分离频率

种名	总菌株数及分离频率 (%)	小麦	玉米	水稻
		分离菌株数及分离频率 (%)	分离菌株数及分离频率 (%)	分离菌株数及分离频率 (%)
腐皮镰孢	2(0.93)	0(0)	2(1.64)	0(0)
禾谷镰孢	108(50.48)	36(58.06)	72(59.02)	0(0)
轮枝镰孢	30(14.02)	5(15.21)	25(20.49)	0(0)
胶孢镰孢	4(1.87)	0(0)	4(3.35)	0(0)
尖孢镰孢	45(21.02)	9(7.38)	12(9.80)	24(80.00)
层生镰孢	25(11.68)	12(19.35)	7(5.70)	6(20.00)

2.2 分子生物学鉴定

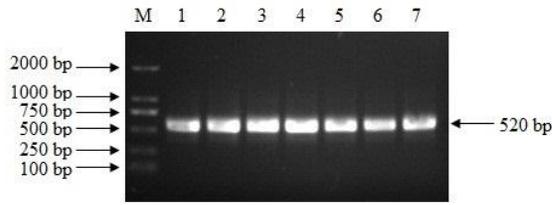


图1 镰孢菌PCR扩增的电泳图谱
左侧:DL-2000 Marker;右侧:520 bpPCR产物
1~4 泳道禾谷镰孢,5 泳道胶孢镰孢,
6 泳道尖孢镰孢,7 泳道层生镰孢

以ITS1、ITS2为引物,对所得镰孢菌基因组DNA进行PCR扩增,将扩增产物用琼脂糖凝胶电泳检测。结果显示,得到了清晰可见、单一的扩增产物条带,大小520 bp左右(图1)。

将被测菌株基因序列放在NCBI BLAST上比对,结果显示:所测菌株相似性均在98%以上。标号3-2的菌株碱基序列属于禾谷镰孢(*F. graminearum*);标号3-5的菌株碱基序列属胶孢镰孢(*F. subglutinans*);标号3-9的菌株碱基序列属于尖孢镰孢(*F. oxysporum*);标号3-13的菌株属层生镰孢(*F. proliferatum*)(表3)。

表3 所测菌株基因序列与基因库中现有序列比对结果

代码	所测序列	碱基数(bp)	相似性(%)	种名
3-2	EF-1a	511	99	禾谷镰孢
3-5	EF-1a	501	98	胶孢镰孢
3-9	EF-1a	503	98	尖孢镰孢
3-13	EF-1a	510	99	层生镰孢

2.3 污染率调查

对所采集的3种禾谷类作物进行污染率调查,结果显示:3种作物在黑龙江省、吉林省、辽宁省污染率分别为,水稻:29.20%、39.30%、3.75%;小麦:57.50%和20.00%;玉米:7.50%、9.40%、

17.50%。在分离得到的病原菌中,以镰孢菌属出现频率最高,初步确定东北三省禾谷类作物穗部病害的主侵染源为镰孢菌。表4和表5为各个地区分离得到的病原菌总污染率调查。

表4 东北三省各地区病原菌总污染率情况

地区	市县	检测谷粒数	总污染率(%)	寄主植物种类
黑龙江省	哈尔滨	80	27.5	水稻
	五大连池	40	35.0	小麦克旱
	绥化	80	20.0	水稻、玉米
	黑河	40	80.0	小麦
	双城五家镇	40	12.5	玉米
	齐齐哈尔	40	2.5	玉米
吉林省	通化	160	29.4	水稻
	长春	120	52.5	水稻、小麦
	吉林市	40	2.5	玉米
	延边州	40	ND	玉米
	松原	80	17.5	玉米
辽宁省	沈阳	80	ND	玉米、水稻
	鞍山	80	20.0	玉米水稻
	丹东	80	25.0	玉米
	辽阳	40	20.0	小麦

注:ND:未发现

表5 不同省份采集的谷物的污染率调查 %

省份	不同寄主植物的污染率		
	水稻	玉米	小麦
黑龙江省	29.2	7.5	57.5
吉林省	39.3	9.4	-
辽宁省	3.75	17.5	20.0

3 总结与讨论

本研究中由于病株采集后易干枯失水,因此采样与分离之前时间要尽量缩短。病原菌分离上采用传统组织分离法,进行分离之前,为避免后续分离中不必要的麻烦用流水冲洗掉样本表面的腐生菌。升汞和酒精是传统组织分离法常用到的两种消毒剂,消毒过程尽量缩短,避免因时间控制不好杀死病样的病原菌。分离后的病原菌要在24 h内及时转出、纯化,原因为镰孢菌定殖生长较快,若未及时转出容易将皿内腐霉菌覆盖而造成相互污染,根据陈绍江等^[9]的研究:若湿度适宜且同时存在两种菌,镰孢菌侵染速度要低于腐霉菌。

因此可根据菌落的生长速度不同,将长出菌丝的菌落陆续地分离出来。

在形态学鉴定方面,以Nelson^[7]、Booth^[5]的分类系统为主要参考依据,同时结合Gerlach^[10]、Leslie^[11]、王拱辰^[12]等的分类方法。稳定形状、不稳定形状、培养形状镰孢菌是形态学鉴定主要的三个方面,在镰孢菌鉴定过程中作为鉴定的辅助依据使用。他们各自的特点为:稳定形状有一些生长状态相对稳定的微观性状,比如分生孢子梗类型,大、小型分生孢子形状和数量,分生孢子着生状态等;不稳定形状具有某些特定微观性状不易产生以及它们的产生耗时较长的特点,比如分生孢子座;培养形状主要参考镰孢菌在培养基上生长过程中的菌落颜色、生长速度等。镰孢菌的培养形状还会受到多种外界条件的影响,比如培养时间、光照、温度、湿度、pH、培养基成分等。诸多

原因导致不同镰孢菌可能在形态特征上极易相互混淆,对镰孢菌鉴定工作带来更大的挑战^[13]。因此,本研究在传统形态学鉴定的基础之上辅之以分子生物学手段来继续鉴定,对ITS区进行PCR扩增、测序及序列分析,有效保证了本研究鉴定结果的准确程度。

参考文献:

- [1] Yli-Mattila T, Bulat S A, Nirenberg H I. Molecular morphological and phylogenetic analysis of the *Fusarium avenaceum* species[J]. Fungal Genet Biol, 2002, 106(6): 655-669.
- [2] 赵志慧. 中国禾本科作物上镰孢菌属真菌分类的研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学, 2008.
- [3] 张向民. 镰刀菌属分类学研究历史与现状[J]. 菌物研究, 2005, 3(2): 59-62.
- [4] 卢维宏, 黄思良, 陶爱丽, 等. 玉米穗腐病样品中层出镰孢菌的分离与鉴定[J]. 植物保护学报, 2011, 38(3): 233-239.
- [5] Booth C. The Genus *Fusarium*[M]. Kew Surrey England: Commonwealth Mycological Institute Press, 1971: 20-68.
- [6] 王拱辰. 浙江镰刀菌志[M]. 杭州:浙江科学技术出版社, 1992: 1-72.
- [7] Nelson P E, Toussoun T A, Marasas W F O. *Fusarium* species: An illustrated Manual for Identification[M]. Pennsylvania: Pennsylvania State University Press, 1983: 1-193.
- [8] Goodwin S B, Drenth A, Fry W E. Cloning and genetic analyses of two highly polymorphic, moderately repetitive nuclear DNAs from *Phytophthora infestans*[J]. Current Genetics, 1992(22): 107-115.
- [9] 陈绍江, 宋同明, 吴全安. 玉米青枯病病原腐霉对其伴生镰孢菌的影响[J]. 植物病理学报, 1997, 27(3): 251-256.
- [10] Gerlach W. The genus *Fusarium*- a pictorial atlas[M]. Berlin: kommissionsverlag P. Parey, 1982: 209.
- [11] Leslie J E. Mating populations in *Gibberella fujikuroi*[J]. Phytopathology, 1991(81): 1058-1060.
- [12] 王拱辰, 郑重, 叶琪明, 等. 常见镰刀菌鉴定指南[M]. 北京:中国农业出版社, 1996: 21-32.
- [13] Brayford D. The Identification of *Fusarium* species[M]. Egham UK: International Mycological Institute, 1993: 119.

(责任编辑:范杰英)