

水稻稻曲病及检测方法

阳 丽, 操志林, 魏敏芝, 童桂鸿, 邓家军

(江西农产品质量安全检测中心, 南昌 330000)

摘要: 稻曲病是世界水稻生产的重要病害之一。本文主要介绍稻曲病的主要症状及危害、生物学特征、侵染过程, 并从普通PCR和实时荧光PCR两个方面, 分别介绍了稻曲病定性和定量检测方法, 为以后开展稻曲病的相关研究提供一定的参考。

关键词: 稻曲病菌; 侵染机制; 检测方法

中图分类号: S435.111

文献标识码: A

文章编号: 1003-8701(2016)02-0067-03

Studies on Infection Mechanisms and Detection Methods of *Ustilagionidea vi-rens*

YANG Li, CAO Zhilin, WEI Minzhi, TONG Guihong, DENG Jiajun

(Testing Center of Agro-Products Quality and Safety of Jiangxi Province, Nanchang 330000, China)

Abstract: *Ustilagionidea vi-rens* is one of the most serious rice diseases of worldwide. The symptom, hazard, biological characteristic, infection mechanism of *Ustilagionidea vi-rens* were introduced in the paper. PCR and HPLC detection method were introduced in detail, so as to provide reference for related researches in the future.

Key words: *Ustilagionidea vi-rens*; Infection mechanism; Detection method

稻曲病(Rice False Smut)是一种世界性的水稻真菌病害, 典型症状是在水稻穗部产生稻曲球。1878年稻曲病首次在印度被Cooke发现, 之后在世界不同的水稻栽培区陆续出现, 目前报道水稻稻曲病已广泛分布在澳大利亚、埃及、孟加拉国、巴西、印度、日本、菲律宾、中国等40多个国家, 尤其在印度、日本、菲律宾、中国发病最严重^[1]。

在20世纪30、40年代, 我国的江南、华南、西南及东北稻区也有稻曲病的报道, 随着科学技术的发展, 耕作制度变化, 生产条件改善和生产水平提高, 造成在田间的水稻稻曲病逐年加重, 尤其在江苏、浙江、江西、四川等十多个省份普遍发生, 并有日益严重的趋势^[2]。2015年, 由于年降水量充足, 日平均气温低, 造成江西省内早中晚稻大面积爆发稻曲病。稻曲病菌毒素不仅对动物生长产生伤害, 而且对人体的健康构成一定的危害^[3]。因此控制水稻稻曲病的发生, 对我国的水稻品质及稻米生产安全显得尤为重要。本文主要

介绍稻曲病的主要症状及危害、生物学特征、侵染机理和几种常见的检测方法, 为以后开展稻曲病的相关研究提供一定的参考。

1 水稻稻曲病侵染机理的研究概况

1.1 水稻稻曲病的症状

水稻主要在抽穗开花期易感染稻曲病, 病原菌侵入谷粒, 会在被侵害谷粒的颖壳内形成菌丝, 颖壳会逐渐被撑大胀开, 最后形成圆形或椭圆的“稻曲”^[4-6]。颜色为白色、黄绿色、墨绿色、黑色, 最主要是黄色或墨绿色。稻曲球多数分布在穗下部, 曲球出现几率达60%, 中部和上部的几率分别为32%和8%^[7]。在田间, 稻曲病通常是零星发生, 或仅发生于单个谷穗, 很少有几个谷穗共同发病。但在重病田间, 也常有几个穗子连在一起同时发病的。

1.2 水稻稻曲病的危害

稻曲病的危害主要是对水稻产量和品质的影响, 感染稻曲病的谷粒的病穗率为1%~10%^[8], 每个病穗上一般有病粒1~10粒, 多者达30~50粒^[9], 从而导致稻谷产量减产高达30%以上^[10]。研究表明, 单穗千粒重随病粒的增多而降低, 同时随着病粒数的增加, 造成空瘪率增多, 整米

收稿日期: 2015-12-13

基金项目: 国家农产品质量安全风险评估(GJFP201500701)

作者简介: 阳 丽(1983-), 女, 工程师, 主要从事水稻风险评估和农作物转基因成分检测。

率逐渐降低,青米率、死米率、乳白米率随之升高,并严重污染稻谷,影响米质,降低商品价值^[11]。稻曲病菌毒素对种子的萌发、根芽的生长均有影响^[12]。

稻曲病不仅影响水稻产量和品质,而且稻曲毒素对人、畜和植物都有危害,毒素主要引起细胞不能进行正常的有丝分裂,并且发现其中的两种毒素对人体的肿瘤细胞有丝分裂具有抑制作用,但对于很多微生物均没有抑制效果。据研究,定期喂食稻曲病谷粒的老鼠、鸡、兔会引起其心脏、肾脏、肝脏病变,从而造成死亡^[13-14]。

1.3 稻曲病菌的生物学特征

稻曲病是一种真菌性病害^[15],感染稻曲病的谷粒呈球状,一般发生稻穗的下部,其表面主要呈黄绿色和墨绿色,其直径大小在0.5~1.5 cm^[7]。目前大多数研究者认为,稻曲病病原菌大致分为两类:无性态和有性态。无形态为无性孢子类绿核菌属绿核菌(*Ustilaginoidea virens* (Cooke) Takahashi),有性态为子囊菌亚门麦角菌属稻麦角菌(*Claviceps oryzaesativae* Hashioka)^[16]。在水稻扬花期,平均气温在25~30℃,在3~5 d连阴雨天的环境下,水稻稻曲病最易爆发,稻曲病菌可以产生3种孢子形态,分别为无形态的厚垣孢子、子囊孢子和有形态的分生孢子。一般最常见为厚垣孢子,其呈圆形或椭圆形,黄色至墨绿色,孢壁厚密,表面有许多刺突,大小为(4.5~7.8) μm×(4.5~7) μm,一般萌发的温度为25~30℃,最适宜温度为28℃,萌发的最适pH为5~8^[17]。稻曲病菌的菌核进一步萌发形成子囊壳,内含有子囊,每个子囊内有8个透明子囊孢子,在电镜扫描下其表面光滑呈细线状,大小为(40~180.5) μm×(0.50~1.04) μm,子囊孢子也可以萌发形成分生孢子。分生孢子又为薄壁孢子,圆形或椭圆形,表面光滑透明,大小为(2.6~8) μm×(2~5) μm,单孢,萌发的适宜温度为21~31℃,最适宜为28℃,对酸碱度敏感,最适宜pH 6~7^[18]。分生孢子继续萌发能产生菌丝,在其上会产生次生分生孢子^[19],这3种孢子均可侵染水稻,从而诱发水稻稻曲病发生^[20]。

1.4 稻曲病菌的侵染过程

稻曲病菌病原菌首先由水稻的花丝侵入,从花丝和浆片中吸取养分,最初会产生大量的菌丝,大约经过一周,大部分菌丝突破颖壳,形成肉眼可见的菌丝团。随着菌丝外露,在其表面会形成一层白色薄膜包裹的菌丝,约一周之后,老化菌丝形成初期黄色厚垣孢子,冲破白色薄膜,内

层新鲜菌丝会被外层的黄色粉末厚垣孢子包裹,当其受到外界环境条件的影响,黄色厚垣孢子会慢慢地变成黑色或墨绿色^[21]。也有报道显示,稻曲球颜色还有黄色和白色,一般一个谷粒上产生一颗稻曲球,但是在发病较严重的稻田里,邻近谷粒也会一起产生稻曲球的现象,甚至稻曲球会黏在一起^[5, 22-23]。

2 几种稻曲病的检测方法

近来,许多研究者根据稻曲病菌分子特异性,利用分子遗传学技术对其进行研究^[24]。在水稻生长的不同阶段分别取样,利用稻曲病菌特异性引物,进行Nested PCR扩增,分析稻曲病菌在植株上的附着情况,结果表明处于破口期的穗部标样带菌率达95%以上^[25]。陈福如等^[26]采用SCAR标记计数和巢式PCR技术从田间自然感病病穗未显症的谷粒、健穗谷粒的颖壳表面以及从注射和喷雾接种的稻苞幼颖组织中均可检测到稻曲病菌,可有效用于稻曲病菌分子鉴定、谷粒带菌检测、水稻体内病菌的早期快速检测及田间病菌种群发生动态监测。

定性PCR只能检测出水稻中是否含有稻曲病,但是实时荧光PCR可以进行水稻稻曲病定量检测。经研究发现, α -tubulin-2和 β -tubulin可以作为稻曲病菌的内参基因^[27]。对样品之间和样品内部的转录量进行校正和标准化,同时可以提高实时荧光PCR的灵敏度和重复性^[28]。郑静等^[29]利用稻曲病菌核糖体转录间隔区序列的特异性,设计引物探针组合,可特异性检测出稻曲病菌,且扩增基线平整,指数扩增明显,重现性好,从而建立了稻曲病菌分生孢子定量PCR法,同时可用于田间孢子捕捉样本的定量检测。

实时荧光PCR只能定量检测出稻曲病菌,而目前,国内外研究者已经从水稻稻曲球中分离出稻曲病菌毒素A-F^[30],大多数研究者认为,毒素A和B能阻止微管蛋白的聚合反应,并且对现有的微管蛋白具有解聚作用,从而抑制多种人类肿瘤细胞的有丝分裂,而对细菌和真菌的生长却没有影响,而对C、D、E和F这四种毒素致病机理的相关研究较少。许多研究者利用高效液相色谱的方法对稻曲病菌毒素进行定量检测;Miyazaki等利用高效液相色谱检测出稻曲病菌毒素A,祭芳等^[31]采用固相萃取净化方法,结合高效液相色谱-串联质谱法能够同时进行定量检测出稻曲病毒素A和D,但是这些方法都依赖标准品进行定性定

量分析,而稻曲病毒毒素的标准品尚无商品化生产。研究者采用多次柱层析方法自稻曲球中分离纯化出5种单一稻曲病菌毒素,但该方法过程复杂、费时费力,分离纯化效率低,限制了稻曲病菌毒素的深入研究。卞英方等^[32]采用了PCX混合阳离子交换柱固相萃取净化方法,结合优化的色谱和质谱条件,成功地建立了高效液相色谱-高分辨质谱分离和鉴定5种稻曲病菌毒素A、B、C、D和F的方法,并将此方法对不同生长时期的稻曲球进行了毒素含量变化趋势分析。此方法简便、快速、灵敏度高、定性准确。

3 讨论

近来,稻曲病在某些水稻种植区发病比较严重。但是目前对于稻曲病菌的分子遗传学的研究报道极少,还没有建立起一个遗传转化系统,这些都限制了对其侵染过程和致病机制的认识。还应该加大对稻曲病鉴定的研究,尽快建立一个标准的稻曲病鉴定技术,同时为开展稻曲病抗性基因的鉴定、分子育种奠定基础。本文从普通PCR和实时荧光PCR两个方面,分别介绍了稻曲病的定性和定量检测方法,但依然有许多局限。利用高效液相色谱法对稻曲病菌进行鉴定分析,简便、快速、灵敏度高、定性准确,为稻曲病菌毒素后续的研究提供了依据。

参考文献:

- [1] Dodan D S, Ram S, Sunder R. False smut of rice[J]. Present status Agric Rev, 1996, 17(4): 226-227.
- [2] 黄世文,余柳青.国内稻曲病的研究现状[J].江西农业学报,2002,14(5):45-51.
- [3] 王玉山,朱建华.稻曲病的发生与防治[J].农业科技通讯,1987(6):30-32.
- [4] 赵桂东,李 茹,周玉梅,等.稻曲病病原学及防治技术研究[J].湖南农业科学,2000(5):24-25.
- [5] 黄正兴,刘才南,徐润成.稻曲病发生规律的初步研究[J].江苏农业科学,1984(6):28-32.
- [6] 余敏忠,黎 煌.水稻稻曲病菌菌核田间发生情况调查[J].浙江农业科学,1987(5):238-239.
- [7] Sher Singh, Vijai Pal. False smut of rice- its impact on yield components[J]. Crop Research Hisar, 1992 (5): 246-248.
- [8] 缪巧明,李化瑶.云南省稻曲病的研究进展[J].云南农业科技,1994(3):8-12.
- [9] 董涛海,钱 钧,徐国军,等.稻曲病对粳稻产量损失的测定[J].浙江农业科学,2003(2):85-86.
- [10] Dodan, Ranl Singh. Faise Smut of Rice[J]. Present Status Gric. Rev, 1996, 17(4): 227-240.
- [11] 黄正兴,刘才南,徐润成.稻曲病发生规律的初步研究[J].江苏农业科学,1984(6):28-32.
- [12] 王国良.影响稻曲病厚垣孢子萌发因素的研究[J].植物保护学报,1998,15(4):241-245.
- [13] Nakamura K, Izumiyama N. Lupinosis in rice caused by ustiloxin and a crude extract of fungal culture of *Ustilaginoidea virens* [J]. Proceedings of the Japanese Association of Mycotoxicology, 1992(35): 41-43.
- [14] 高 峻.稻曲病病粒对鸡和兔的毒性[J].植物保护,1987(3):52-53.
- [15] 江植宏.稻曲病的发生及防治对策[J].安徽农学通报,2015,21(11):67-68.
- [16] 周永力,章 琦.稻曲病菌分离技术的初探[J].中国水稻科学,1999,13(3):186-188.
- [17] 张君成,陈志谊,张炳欣,等.稻曲病菌的形态学观察研究[J].植物病理学报,2003,33(6):517-523.
- [18] 毕璋友,檀根甲.我国稻曲病的研究进展[J].安徽农业科学,2005,33(1):132-134.
- [19] Ou S H. Rice Disease[M]. Slough, UK: CAB/CMI, 1985: 307-311.
- [20] 陈永坚,肖炎农,赵永静.稻曲病菌越冬厚垣孢子萌发及其侵染力的研究[J].植物保护学报,1995,22(2):102-106.
- [21] 邬伟刚.环境因子对稻曲病发病程度的影响[D].武汉:华中农业大学,2012.
- [22] Verma P K, Singh R A. Occurrence of physiologic forms in *Ustilaginoidea 47 virens* the cause of false smut of rice[J]. Indian Phytopathology, 1978, 31(1):127-218.
- [23] Honkura R , Miura Y. Occurrence of white false smut of rice plant shows the infection rounte in hill[J]. Annual Report of the Society of Plant Protection of North Japan, 1991(42): 24-26.
- [24] Zhou Y-L, K Izumitsu, R Sonoda. PCR-based specific detection of *Ustiaiginoidea virens* and *Ephelis japonica*[J]. J Phytopathology, 2003, 151(9): 513-518.
- [25] 王 疏,潘雅姣,樊金娟,等.水稻生殖生长期植株上稻曲病菌的PCR检测[J].辽宁农业科学,2005(5):46-47.
- [26] 陈福如,林廷邦,甘 林,等.稻曲病菌的SCAR标记及其PCR检测[J].植物保护学报,2013,40(6):481-487.
- [27] 顾志敏,丁正中,陈析丰,等.实时荧光定量PCR筛选稻曲病菌内参基因[J].中国水稻科学,2012,26(5):615-618.
- [28] Huggett J, Dheda K, Bustin S, et al. Real-time RT-PCR Normalization: Strategies and Consideration[J]. Genes & Immun, 2005, 6(4): 279-284.
- [29] 郑 静,张 震,姜 华,等.稻曲病菌分生孢子实时PCR定量检测方法的建立及初步应用[J].中国水稻科学,2012,26(4):500-505.
- [30] Kosio Y, Li Y, Wasakis, et al. Ustiloxins, antimitotic cyclic peptides form false smut balls on rice panicles caused by *Ustilaginoidea virens*[J]. Journal of Antibiotics, 1994, 47(7): 765-773.
- [31] 祭 芳,曹 欢,徐剑宏,等.高效液相色谱-串联质谱法定量检测稻谷中的稻曲病菌毒素A和D[J].中国水稻科学,2012,26(2):246-250.
- [32] 卞英方,于莎莎,牟仁祥,等.高效液相色谱-高分辨质谱法鉴定水稻稻曲病菌毒素[J].色谱,2015,10(33):1046-1050.

(责任编辑:王 昱)