

胡贤锋, 李荣玉, 王健, 等. 水稻稻曲病菌的分离鉴定及室内毒力测定 [J]. 福建农业学报, 2017, 32 (6): 634—638.
HU X-F, LI R-Y, WANG J, et al. Isolation, Identification and Fungicide Toxicity of *Ustilaginoidea virens* [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2017, 32 (6): 634—638.

水稻稻曲病菌的分离鉴定及室内毒力测定

胡贤锋^{1,2}, 李荣玉^{1,2,3}, 王健^{1,2}, 李明^{1,3*}, 李思博⁴, 黄永会^{1,2}, 吴帅^{1,2}, 赵琪君^{1,2}

(1. 贵州大学作物保护研究所, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州大学农学院, 贵州 贵阳 550025;
3. 贵州省山地农业病虫害重点实验室, 贵州 贵阳 550025;
4. 沈阳农业大学植物保护学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘要: 为优化稻绿核菌的分离方法, 筛选防控稻曲病的有效药剂, 采用孢子敲落法和火焰灼烧法分别分离不同成熟度的稻曲球, 从形态学、致病性、rDNA-ITS 序列等方面对 HP-7 菌株进行鉴定, 并通过菌丝生长抑制法测定了 HP-7 菌株对 7 种杀菌剂的敏感性。结果表明, 采用孢子敲落法分离鲜黄色稻曲球成功率最高, 达 98.33%, 将 HP-7 菌株的 rDNA-ITS 序列在 NCBI 上进行 BLAST 比对, 菌株 HP-7 与稻绿核菌相似度达 99%, 结合形态学特征分析确定 HP-7 为稻绿核菌。离体试验表明, 戊唑醇和啮菌酯对稻绿核菌的菌丝生长抑制作用最强, 其 EC_{50} 值分别为 0.109 1、0.158 5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。其结果可为稻绿核菌的分离鉴定及稻曲病防控提供理论参考。

关键词: 稻曲病; 稻绿核菌; 分离鉴定; 室内毒力

中图分类号: S 435

文献标识码: A

文章编号: 1008—0384 (2017) 06—634—05

Isolation, Identification and Fungicide Toxicity of *Ustilaginoidea virens*

HU Xian-feng^{1,2}, LI Rong-yu^{1,2,3}, WANG Jian^{1,2}, LI Ming^{1,3*}, LI Si-bo⁴, HUANG Yong-hui^{1,2},
WU Shuai^{1,2}, ZHAO Qi-jun^{1,2}

(1. Institute of Crop Protection, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China; 2. College of Agriculture, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China; 3. The Provincial Key Laboratory for Agricultural Pest Management in Mountainous Region, Guiyang, Guizhou 550025, China; 4. College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161, China)

Abstract: Two methods for isolating HP-7 (*Ustilaginoidea virens*) and 7 fungicides for controlling the false smut disease on rice caused by the pathogen were compared. Fungal spores at different maturation stages were separated by means of shaking or flame burning. HP-7 was verified by its morphology, pathogenicity, and rDNA-ITS sequences. The sensitivity of HP-7 toward and toxicity on the fungi by the fungicides were determined based on the fungal mycelium growth under treatment. It was found that the successful rate in separating the fresh yellow chlamydospores by shaking was up to 98.33%, which was better than the flaming method. The rDNA-ITS sequences of HP-7 were submitted to NCBI for a BLAST analysis that showed a 99% homogeneity with *U. virens*. Combining that result with the morphological observations, HP-7 was verified to be the pathogen that caused the rice false smut. Among the fungicides tested, tebuconazole and azoxystrobin exhibited the highest inhibition rates on HP-7, with EC_{50} at 0.109 1 and 0.158 5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. It appeared that an effective spore separation method was identified, and the positive identification and appropriate selection on fungicide for effective control of the false smut disease on rice crops were obtained.

Key words: rice false smut; *Ustilaginoidea virens*; identification; laboratory toxicity test

收稿日期: 2017—03—22 初稿; 2017—05—10 修改稿

作者简介: 胡贤锋 (1993—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 农产品质量安全研究 (E-mail: 1418083255@qq.com)

* 通讯作者: 李明 (1959—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 农产品质量安全、植物源农药及其毒理 (E-mail: lm21959@163.com)

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2016YFD0200500); 国家公益性行业 (农业) 科研专项 (201503107); 贵州省科技支撑计划项目 (黔科合支撑 [2016] 2534 号); 贵州大学引进人才科研项目 [贵大人基合字 (2015) 07 号]; 大学生创新创业训练计划项目 [贵大 (省) 创字 2016 (026)]

稻曲病是由半知菌亚门稻绿核菌 *Ustilaginoidea virens* (Coole) Takahashi 侵染水稻颖花引起的真菌性病害^[1]。稻绿核菌侵染后,导致水稻颖花上形成体积数倍于正常稻谷的球状菌落,即稻曲球^[2]。近年来,由于我国高产杂交稻大面积推广,耕作方式的改变及稻田肥水水平不断提升,该病发生面积逐年扩大,已成为我国各稻区普遍发生的重要病害。稻曲病不仅导致水稻大面积减产,稻绿核菌产生的高浓度环状寡肽毒素能够抑制动物细胞的有丝分裂和微管蛋白的组装,严重影响着大米的品质与食用安全^[3]。

稻曲球是稻绿核菌分离的主要材料^[4]。但由于稻曲球自身营养物质丰富,加之其表面存在大量孔隙,极易被杂菌污染;且稻绿核菌在人工培养条件下生长极慢,从而加大了稻绿核菌的分离难度^[5]。迄今,水稻生产中仍缺乏相应的抗性品种,药剂防治依旧是防控稻曲病的主要措施,但由于单一药剂的累年使用,加之施药水平高,极易导致稻绿核菌产生抗药性,从而影响稻曲病的防控效果^[6]。鉴于此,笔者明确了不同成熟度稻曲球的适宜分离方法,提高了稻绿核菌分离成功率,并对分离到的 HP-7 菌株进行了鉴定,通过菌丝生长速率抑制法测定了 7 种杀菌剂对 HP-7 菌株的室内毒力,旨在为稻绿核菌的分离鉴定及稻曲病的田间防控策略的制定提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 分离材料 2016 年 8 月于贵州黄平试验基地采集新鲜稻曲球置于冰箱保鲜备用。

1.1.2 培养基 PSA 培养基:马铃薯 200 g,蔗糖 15~20 g,琼脂 18~20 g,蒸馏水 1 000 mL。

1.1.3 供试药剂 95%甲基硫菌灵原药(安徽广信农化股份有限公司)、97%戊唑醇原药(盐城利民农化有限公司)、60%井冈霉素原药(浙江省桐庐汇丰生物科技有限公司)、97%苯醚甲环唑原药(江苏耕耘有限责任公司)、97.3%嘧菌酯原药(安徽华星化工有限公司)、95%己唑醇原药(江苏七州绿色化工)、98%多菌灵原药(江苏江阴凯江农化有限公司)、利福平胶囊(成都锦华药业有限责任公司)。

1.1.4 接种体 菌丝-孢子混合液:将稻绿核菌单孢菌株移植到 PSA 培养基中,28℃ 及 130 r·min⁻¹ 的条件下振荡培养,15 d 后用研钵将菌丝充分研碎,即可得到菌丝-孢子混合液作为接种体。

1.2 方法

1.2.1 稻绿核菌的分离 孢子敲落法^[7]:用无菌镊子夹住稻曲球,将孢子粉抖落在无菌滤纸片上,再将孢子粉稀疏撒落在含利福平 PSA 培养基上,恒温培养 3~4 d,若观察到 PSA 培养基上产生白色点状菌落,将白色菌落挑到新鲜的 PSA 培养基上,10 d 后观察菌落形态。火焰灼烧法:将稻曲球用无菌镊子夹住,置于 75% 的酒精中浸泡,待稻曲球表面完全湿润后取出,在酒精灯外焰来回过几下,迅速用无菌水浸泡 15 s 后,切成小块挑至含利福平 PSA 培养基上。18 d 后观察菌落生长情况。采用 2 种方法分别分离鲜黄色、黄绿色、墨绿色的稻曲球,每次分离 20 颗,3 次重复,并统计每次分离的成功率。

1.2.2 接种试验 2016 年 9 月在贵州大学农学院教学试验基地稻田进行稻绿核菌致病性鉴定。在水稻破口前 7 d,于 16:00 用无菌注射器吸取接种液,从穗苞侧面注入至接种液溢出,然后喷水套袋保湿 24 h,21 d 后观察发病情况^[8]。

1.2.3 稻绿核菌的 rDNA-ITS 序列分析 参照陈吉良等^[9]的方法提取病原菌 DNA。引物为 ITS1 与 ITS4。20 μL PCR 反应体系包括:DNA 模板 1.5 μL,ITS1 和 ITS4 各 1 μL,5 U·μL⁻¹ *Taq* DNA 聚合酶 0.1 μL,10×PCR Buffer 2 μL,2.5 mmol·L⁻¹ dNTPs Mixture 1.6 μL,ddH₂O 12.8 μL。PCR 扩增程序为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 1 min,54℃ 复性 1 min,72℃ 延伸 1 min,共 35 循环;最后 72℃ 10 min。对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,回收目的片段后进行连接转化,送上海生工生物工程有限公司测序,在 BLAST 软件中对测序结果进行同源性比对,并借助 MEGA6.0 软件构建系统发育树。

1.2.4 室内毒力测定 采取菌丝生长速率抑制法^[10]对稻绿核菌的进行室内毒力测定。菌丝生长速率抑制法:将 7 种药剂都配制成 10 000 mg·L⁻¹ 母液,依据预试验结果将母液稀释成 5 个质量浓度梯度的药液,其质量浓度分别为:戊唑醇 0.031 25、0.062 50、0.125 00、0.250 00、0.500 00 mg·L⁻¹;甲基硫菌灵 0.05、0.10、0.20、0.40、0.80 mg·L⁻¹;嘧菌酯和己唑醇 0.125、0.250、0.500、1.000、2.000 mg·L⁻¹;多菌灵和苯醚甲环唑 0.05、0.10、0.20、0.40、0.80 mg·L⁻¹;井冈霉素 12.5、25.0、50.0、100.0、200.0 mg·L⁻¹,并将稀释后的药液加入 PSA 培养基中制成含药平板,以无菌水为对照。于菌落边缘打取直径为 5 mm 稻绿核菌菌饼,接种

于含药 PSA 平板中央, 每个处理重复 4 次, 28℃ 恒温培养。20 d 后, 采用交叉法测量菌落直径, 并借助 DPS 数据处理系统分析所得数据。

2 结果与分析

2.1 分离结果

通过孢子敲落法和火焰灼烧法分别分离鲜黄色、黄绿色、墨绿色 3 种不同成熟度的稻曲球。结果(表 1)表明, 采用孢子敲落法分离时, 平均分离成功率: 鲜黄色稻曲球 (98.33%) > 黄绿色稻曲球 (1.66%) > 墨绿色稻曲球 (0%); 采用火焰灼烧法分离时, 平均分离成功率: 鲜黄色稻曲球 (63.33%) > 黄绿色稻曲球 (31.66%) > 墨绿色稻曲球 (5%)。由此可知, 采用孢子敲落法分离鲜黄色稻曲球成功率最高, 黄绿色稻曲球应采用火焰灼烧法分离, 墨绿色稻曲球不适合作为分离材料。

表 1 2 种分离方法分离不同成熟度的稻曲球的分离效果
Table 1 Two methods for separating rice smut spores at different maturation stages

分离方法	稻曲球	分离成功率/%	分离成功率/%	分离成功率/%	平均成功率/%
孢子敲落法	鲜黄色	95	100	100	98.33
	黄绿色	5	0	0	1.66
	墨绿色	0	0	0	0
火焰灼烧法	鲜黄色	70	55	65	63.33
	黄绿色	40	35	20	31.66
	墨绿色	0	5	10	5

从分离到的菌株可以看出, 菌落呈圆形, 中央凸起, 外观形态酷似帽子, 菌丝白色, 绒毛状, 菌落背面鲜黄色, 后期墨绿色(图 1)。镜检发现该菌生长后期菌丝粗大、呈念珠状、分支多, 有明显隔膜, 厚垣孢子为橘黄色或黄褐色, 球形或近椭圆形(图 2), 与陈丽等^[11]报道一致。

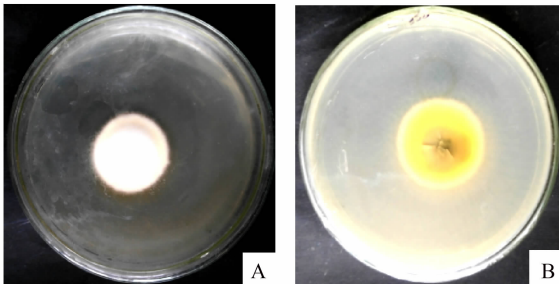


图 1 稻绿核菌的菌落形态
Fig. 1 Colony morphology of *U. virens*

注: A 为正面, B 为背面。

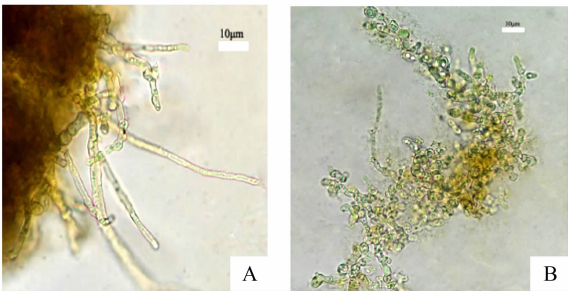


图 2 稻绿核菌的菌丝 (A) 和厚垣孢子 (B)
Fig. 2 Hypha (A) and chlamydospore (B) of *U. virens*

2.2 致病性鉴定

用注射法将菌丝-孢子混合液回接到健康的水稻稻穗上, 接种 3 周后产生特征明显的鲜黄色稻曲球, 稻曲球后期逐渐变成墨绿色(图 3), 症状与田间自然发病的植株无异, 表明所分离到的菌株有较强的致病能力。将发病病样进行分离, 纯化培养, 其菌落形态特征与接种菌株一致。

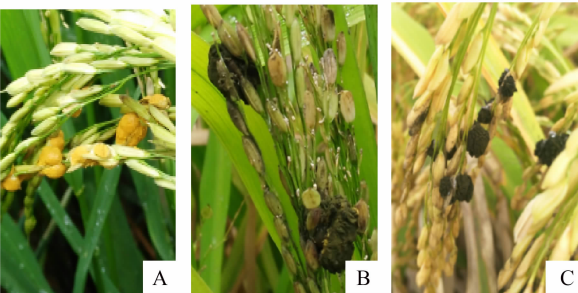


图 3 稻曲病的发症状况
Fig. 3 Symptom of false smut disease on rice
注: A、B、C 分别为鲜黄色、黄绿色和墨绿色稻曲球。

2.3 病原菌的 rDNA-ITS 序列分析

用通用引物 ITS1/ITS4 对 HP-7 菌株进行 PCR 扩增, 从琼脂糖凝胶电泳图(图 4)可以看出, ITS 长度在 500~750 bp, 与标准菌株(UV-

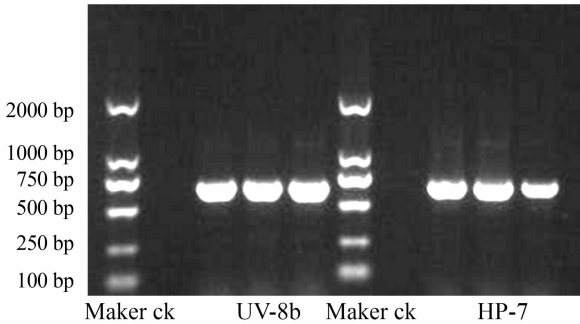


图 4 稻绿核菌 rDNA-ITS 序列 PCR 扩增产物
Fig. 4 rDNA-ITS PCR amplified products of *U. virens*

8b) 长度一致, 并对扩增产物进行测序, 将测序结果在 NCBI 上用 BLAST 软件进行同源性比对发现, HP-7 菌株与稻绿核菌 *Ustilaginoidea virens* 相似度达 99%。从系统发育树(图 5)可知, HP-7 菌株同 *Ustilaginoidea virens* (KX243273.1) 处同一分支, 进化距离最近, 可确定分离到的 HP-7 菌株为稻绿核菌。

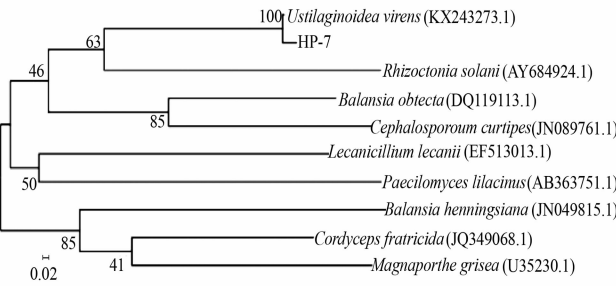


图 5 HP-7 菌株基于 rDNA-ITS 序列的系统发育树
Fig. 5 Phylogenetic tree based on rDNA-ITS sequences of HP-7 strain

2.4 不用药剂对稻绿核菌的抑制作用

7 种供试药剂对稻绿核菌的室内毒力测定结果(表 2)表明, 稻绿核菌对 7 种供试药剂的敏感性存在差异。其中, 稻绿核菌对戊唑醇和嘧菌酯的敏感性最高, 其 EC_{50} 值分别为 0.109 1、0.158 5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 对苯醚甲环唑和己唑醇的敏感性次之, EC_{50} 值分别为 0.207 1、0.279 2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 对多菌灵与甲基硫菌灵的敏感性相对较低, EC_{50} 值分别为 0.913 7、2.188 1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 对井冈霉素的敏感性最差, EC_{50} 值高达 49.677 3 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。回归方程的斜率值(k)在一定程度反映病原菌对杀菌剂的敏感性。依据斜率(k)可将供试药剂分成 2 类: 戊唑醇、苯醚甲环唑、嘧菌酯、己唑醇, $k > 2$, 是供试原药中斜率值(k)较大的, 说明稻绿核菌对这 3 种药的敏感性相对较高; 井冈霉素、甲基硫菌灵、多菌灵, $k < 2$, 是供试原药中斜率值(k)较小的, 说明稻绿核菌对这 3 种农药的敏感性相对较低。

表 2 7 种杀菌剂对绿核菌的室内毒力
Table 2 Laboratory toxicity determination on 7 fungicides against *U. virens*

药剂	供试药剂质量浓度 /($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)					毒力回归方程(y)	相关系数 (r)	EC_{50} / ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
戊唑醇	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.03125	$y = 6.9689 + 2.0454x$	0.9644	0.1091
井冈霉素	200	100	50	25	12.5	$y = 2.5989 + 1.4157x$	0.9896	49.6773
苯醚甲环唑	1.6	0.8	0.4	0.2	0.1	$y = 6.4634 + 2.1397x$	0.9849	0.2071
甲基硫菌灵	0.8	0.4	0.2	0.1	0.05	$y = 4.6507 + 1.0272x$	0.9852	2.1881
嘧菌酯	2	1	0.5	0.25	0.125	$y = 6.9368 + 2.4213x$	0.9974	0.1585
己唑醇	2	1	0.5	0.25	0.125	$y = 6.4263 + 2.5744x$	0.9973	0.2792
多菌灵	1.6	0.8	0.4	0.2	0.1	$y = 5.0768 + 1.9426x$	0.9816	0.9137

3 讨论与结论

稻曲球营养物质丰富, 极易污染杂菌, 给稻绿核菌的分离带来了极大的困难。本研究在刘明霞等^[12]的基础上, 明确了不同成熟度稻曲球的适宜分离方法, 提高了稻绿核菌的分离成功率。试验结果可知: 采用孢子敲落法分离稻绿核菌的成功率为: 鲜黄色稻曲球 (98.33%) > 黄绿色稻曲球 (1.66%) > 墨绿色稻曲球 (0%); 火焰灼烧法分离稻绿核菌的成功率为鲜黄色稻曲球 (63.33%) > 黄绿色稻曲球 (31.66%) > 墨绿色稻曲球 (5%)。表明鲜黄色稻曲球为稻绿核菌分离的最佳材料, 墨绿色稻曲球不宜作为分离材料, 鲜黄色稻曲球和黄绿色稻曲球分别适合采取孢子敲落法与火焰灼烧法进行分离。

通过致病性鉴定发现, HP-7 菌株具有较强的致病能力, 接种到健康的稻穗后能够引起稻穗发病, 其症状与田间自然发病植株无异, 并对回接发病的稻穗进行分离, 得到形态一致的菌株, 其形态特征与张君成等^[13]一致。结合 rDNA-ITS 序列分析, 确定 HP-7 菌株为稻绿核菌。

室内毒力测定试验结果表明, 7 种药剂对稻绿核菌的菌丝生长均有一定抑制作用, 稻绿核菌对 7 种药剂的敏感性大小为: 戊唑醇 > 嘧菌酯 > 苯醚甲环唑 > 己唑醇 > 多菌灵 > 甲基硫菌灵 > 井冈霉素, 其中戊唑醇对稻绿核菌菌丝生长的抑制作用最强, EC_{50} 为 0.109 1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 嘧菌酯、苯醚甲环唑、己唑醇、多菌灵的效果较好; 井冈霉素的抑制效果最差, EC_{50} 为 49.667 3 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。稻绿核菌对甲基硫菌灵的敏感性较低, 可能是由于生产上累年使

用,或与不同稻区的稻绿核菌对甲基硫菌灵敏感性存在差异有关,而井冈霉素为生物农药,相较于化学农药抑制效果稍差。室内药剂筛选结果可以看出供试药剂对菌丝均有较好的抑制效果,该结果可为水稻生产上防治稻曲病时药剂的选择提供理论参考。但田间防治受众多因素的影响,因此,在筛选防控稻曲病的有效药剂时,需田间试验进一步验证,找出安全、高效的药剂来减少农药用量,预防稻绿核菌抗药性的产生及降低农药对稻田的污染^[14]。

参考文献:

- [1] TANAKA E, ASHIZAWA T S R, TANAKA C. *Villosiclava virens* gen. nov. comb. nov. teleomorph of *Ustilaginoidea virens*, the causal agent of rice false smut [J]. *Mycotaxon*, 2008, 106 (11-12): 491-501.
- [2] 胡东维,王疏. 稻曲病菌侵染机制研究现状与展望 [J]. *中国农业科学*, 2012, 45 (22): 4604-4611.
- [3] 李丹阳,邓启得,雍明丽,等. 稻曲病菌菌核降解微生物的筛选与作用机制分析 [J]. *中国生物防治学报*, 2016, 32 (2): 258-264.
- [4] 王永强,樊荣辉,杨炳辉,等. 稻绿核菌(稻曲病菌)分离方法的比较研究 [J]. *菌物学报*, 2010, 29 (1): 59-63.
- [5] 徐晗,白元俊,缪建锐,等. 不同储存时期稻曲病菌分离方法比较研究 [J]. *吉林农业大学学报*, 2017, 39 (1): 1-5.
- [6] 唐爽爽,刘志恒,余朝阁,等. 9 种杀菌剂对西瓜炭疽病菌的室内毒力测定及配比试验 [J]. *植物保护*, 2014, 40 (6): 171-175.
- [7] 林瑜凡. 稻曲病菌分离、培养及接种技术的初步研究 [D]. 雅安:四川农业大学,2009.
- [8] 张君成,张炳欣,陈志谊,等. 稻曲病的接种方法及其效果初探 [J]. *中国水稻科学*, 2003, 17 (4): 390-392.
- [9] 陈吉良,黄小龙,吴安迪,等. 一种快速高效提取病原真菌 DNA 作为 PCR 模板的方法 [J]. *菌物学报*, 2011, 30 (1): 147-149.
- [10] 张亮,袁争,朱蔚,等. 4 种植物提取物对茶炭疽病菌的体外抑制作用 [J]. *植物保护*, 2012, 38 (4): 137-140.
- [11] 陈丽,胡东维,陈美军,等. 稻曲球及稻曲病菌菌落微结构的 SEM 观察 [J]. *菌物学报*, 2007, 26 (1): 89-96.
- [12] 刘明霞,秦姝,李颖,等. 稻曲病菌分离技术、培养条件研究 [J]. *辽宁农业科学*, 2009, 50 (6): 20-22.
- [13] 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.
- [14] 钱双宏,沈林波,熊国如,等. 甘蔗褐条病病原菌分离鉴定及其室内毒力的测定 [J]. *热带作物学报*, 2015, 36 (2): 353-357.

(责任编辑:林海清)