

李 雪, 孙宇佳, 刘 瑞, 等. 黑龙江省水稻穗腐病致病菌(*Alternaria* spp.) 的鉴定及生物学特性分析[J]. 江苏农业科学, 2023, 51(19): 102–109. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2023.19.016

黑龙江省水稻穗腐病致病菌(*Alternaria* spp.) 的鉴定及生物学特性分析

李 雪¹, 孙宇佳¹, 刘 瑞¹, 付忠举¹, 靳学慧¹, 华丽霞², 张亚玲¹

(1. 黑龙江八一农垦大学/黑龙江省植物抗性研究中心, 黑龙江大庆 163319; 2. 四川省农业科学院经济作物育种栽培研究所, 四川成都 610300)

摘要: 黑龙江省是我国水稻主产区, 近年水稻穗腐病(rice spikelet rot disease, 简称 RSRD) 对黑龙江省水稻产区的产量与质量造成的危害越来越严重。本研究旨在对黑龙江省水稻穗腐病致病菌链格孢属(*Alternaria* spp.) 菌株的种类及生物学特性进行分析, 为水稻穗腐病的防控提供参考依据。从黑龙江省病害发生区采集病穗样本, 分离获得病原菌纯培养, 利用分生孢子及菌落形态做形态鉴定, 结合内转录间隔区(internal transcribed spacers, 简称 ITS) 进行分子鉴定, 菌丝生长速率法明确其生物学特性再采用水解圈法测定 3 种外分泌酶的产生情况。研究结果表明, 黑龙江省水稻穗腐病的主要致病菌为 *Alternaria* spp., 占总病原数量的 83.43%; 根据菌落及分生孢子形态把 *Alternaria* spp. 分成 8 种类型, ITS 分子鉴定结果可将 *Alternaria* spp. 分为 3 类, 分别为细交链格孢菌(*Alternaria tenuissima*, I 类菌), 占 *Alternaria* spp. 总数的 48.65%; 链格孢菌(*Alternaria alternata*, II 类菌), 占 48.65%; 芸薹链格孢菌(*Alternaria brassicae*, III 类菌), 占 2.70%。选取 8 株代表性菌株进行生物学特性比较, 结果表明 I 类菌的最适生长培养基为马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, 简称 PDA) 培养基或米糠培养基, II、III 类菌的为米糠培养基; 这 3 类菌的最适生长温度范围为 26~30℃, 最适 pH 值范围为 7~10; 葡萄糖或可溶性淀粉为 3 类菌的最适碳源, 牛肉膏或蛋白胨为最适氮源; 8 个菌株均可产生蛋白酶、纤维素酶和淀粉酶等外分泌酶。分析结果表明, *Alternaria* spp. 的不同菌种存在生物学特性差异, 同一菌种的不同菌株也存在生物学特性差异; 首次从水稻穗病样中分离得到芸薹链格孢菌并验证其致病性, 为水稻穗腐病病原菌多样性研究提供了材料。

关键词: 水稻穗腐病; 病原真菌; 链格孢属; 生物学特性; 外分泌酶

中图分类号: S435.111.4⁺6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2023)19-0102-08

水稻穗腐病(rice spikelet rot disease, 简称 RSRD) 是一种由多种真菌引起的水稻穗部病害^[1], 该病在水稻种植区均有不同程度的发生, 严重地块发病率可达 100%, 受害稻穗结实率下降, 千粒质量降低, 减产 5%~10%, 严重可达 30% 以上, 甚至绝收^[2]。国内外研究学者认为, 造成水稻穗腐病的主要病原菌有多种, 如镰孢菌属(*Fusarium* sp.)、链格孢菌属(*Alternaria* sp.)、弯孢菌属(*Curvularia* sp.)、蠕孢菌属(*Bipolaris* sp.)^[3-6]。张俊华等于 2018 年

对黑龙江省穗腐病病原进行鉴定, 从水稻穗腐病样本上分离纯化得到 119 个菌株, 其中链格孢属有 112 株, 认为该菌属为主要致病菌, 经 ITS 鉴定为链格孢^[7]。研究表明, 不同区域的链格孢属优势致病菌有差异, 费丹等将安徽省穗腐病病原菌鉴定为细交链格孢菌^[8]; 胡颂平等将江西省穗腐病病原菌鉴定为细交链格孢菌^[9]。

黑龙江省是我国水稻主产区, 水稻穗腐病每年都有不同程度的发生, 且有逐年加重的趋势。虽然前人研究表明, 黑龙江省水稻穗腐病的病原菌主要是以链格孢菌为主^[10-11], 但前人对链格孢属菌株的鉴定大部分基于形态学鉴定或者是单一菌株的 ITS 分子鉴定, 关于黑龙江省水稻穗腐病致病菌链格孢属的多样性尚未见报道, 对于链格孢属致病机制亦研究较少。

有研究报道, 当病菌侵染菌丝通过组织的细胞侵入时, 会产生一些细胞壁降解酶降解植物组织, 使病菌在细胞间迅速扩展, 病菌侵入组织后, 需要

收稿日期: 2023-01-31

基金项目: 国家自然科学基金(编号: U20A2025); 黑龙江省农垦总局科技攻关项目(编号: HKKYZD190205); 黑龙江八一农垦大学科研启动项目(编号: XDB201802, XDB201605)。

作者简介: 李 雪(1996—), 女, 四川绵阳人, 硕士研究生, 从事植物病理学研究。E-mail: 2294733750@qq.com。

通信作者: 张亚玲, 博士, 教授, 从事植物病理学研究, E-mail: byndzyl@163.com; 华丽霞, 副研究员, 从事植物病理学研究, E-mail: newpage@stu.scau.edu.cn。

大量的能源,病原菌产生的纤维素酶、淀粉酶、蛋白酶和其他酶类在致病过程中通过分解细胞壁和细胞内含物为病原菌提供了丰富的碳氮源,相关外泌酶在病原菌致病过程中起重要作用^[12-13]。本研究旨在分析黑龙江省水稻主产区水稻穗腐病致病菌链格孢属的多样性,明确不同类型链格孢属真菌的生物学特性,同时对各菌株的外泌酶产生情况进行比较分析,以此初步探索链格孢菌属各类菌种的致病机制,为该病的防控提供理论依据。

1 材料与方法

试验于 2021 年 9 月至 2022 年 11 月于黑龙江八一农垦大学植物抗性研究中心实验室与四川省农业科学院经济作物育种栽培研究所完成。

1.1 试验材料

水稻穗腐病病样采集于黑龙江省水稻主产区建三江科研所水稻实验田、绥化市北林区、庆安县、通河县、绥滨县等 5 个地区。接种鉴定供试水稻品种为龙粳 31。

1.2 病原菌的分离与纯化

采用组织分离法^[14]对病原菌进行分离和纯化。采集得到的具有水稻穗腐病症状的稻谷用自来水反复冲洗干净放在滤纸上晾干,将其内外颖壳分离,用灭菌剪刀在病健交界处剪取 2 mm × 2 mm 的病组织,先经乙醇消毒 5 s 后经漂白粉溶液(水溶液与漂白粉比例为 14 mL : 1 g)浸泡 5 min 进行表面消毒,再用无菌水漂洗 3 次,置于无菌滤纸上吸干水分,呈“品”字形转接于 PDA 培养基上,于 28 ℃ 在黑暗条件下培养。待菌落长出后,进行初次镜检,用单孢分离法^[15]从菌落上挑取单个孢子,移至 PDA 培养基上进一步培养,将获得的纯化菌株用滤纸片法^[16]保存备用。

1.3 病原菌致病性验证

将供试水稻种植于直径为 27 cm 的花盆内,待水稻长至孕穗期时,制备浓度为 1×10^5 个/mL 的新鲜孢子悬浮液,使用 2 mL 的医用注射器将孢悬液注入穗苞上部,直至注射部位有 3 ~ 5 滴菌液溢出^[17],接种后的水稻放置于温室内 28 ℃ 保湿培养 24 h,光—暗周期为 12 h—12 h,对照组注射无菌水。6 d 后观察植株发病情况。取发病谷粒,重新分离纯化,将分离纯化得到的菌株与原接种菌株进行形态学比较,验证是否与原接种病原菌相同,从而完成柯赫氏法则验证病原菌的致病性。

1.4 病原菌鉴定

1.4.1 形态鉴定 将菌株接种于 PDA 培养基上,28 ℃ 恒温培养 5 d 后观察菌落形态,用无菌接种刀刮取菌丝,制作临时玻片,使用 ECLIPSE 80i 显微镜观察各菌株分生孢子形态。

1.4.2 分子生物学鉴定 采用 CTAB 法^[18]提取病原菌的基因组 DNA,利用 5.8S rDNA 核糖体内转录间隔区(internal transcribed spacers,ITS)引物对菌株 DNA 进行扩增,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列为 ITS1(5′-TCCGTAGGTGAACTGCGG-3′)和 ITS4(5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′)^[19]。

扩增体系:正反引物各 1.00 μL,9.00 μL ddH₂O,1.50 μL DNA 模板,12.50 μL 2 × Es Taq Master Mix (Dye),总体积 25.00 μL。

扩增程序:94 ℃ 预变性 2 min;94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,共 35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min 后 4 ℃ 保存。扩增产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序,将测序结果在 NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) 中进行 BLAST 比对。选择相关链格孢种菌株的 ITS 序列与供试菌株 ITS 序列作 BLASTn 对比分析,用 MEGA 7.0 软件中的 Neighbor-Joining (NJ)法构建系统发育树进行系统演化分析,检验重复次数(Bootstrap test)为 1 000 次。供试菌株的核酸序列数据 NMDCN0001CE1-NMDCN0001CE8 存储在国家微生物科学数据中心(NMDC),链接为 <https://nmde.cn/resource/genomics/sequence/detail/NMDCXXXX XXXX>。根据分析结果确定病原菌的分类学种名。

1.5 链格孢菌属不同菌株的生物学特性分析

1.5.1 测定不同培养基、温度、pH 值对菌丝生长的影响 从培养 5 d 的菌落边缘取直径为 5 mm 的菌饼,接种于以下条件进行培养:(1)培养基为马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基、马铃薯蔗糖琼脂(PSA)培养基、米糠培养基和查氏(Czapek)培养基,28 ℃ 恒温培养;(2)温度选用 15、20、26、28、30、32 ℃,进行恒温培养;(3)选用 pH 值为 5、6、7、8、9、10、11 和 12 的 PDA 培养基,28 ℃ 恒温培养。每个处理重复 3 次,5 d 后采用十字交叉法^[20]测量菌落直径。

1.5.2 测定不同碳、氮源对菌丝生长的影响 以 Czapek 培养基^[21]为基础培养基,将直径为 5 mm 的菌饼分别接种于 8 种不同的碳源培养基:葡萄糖、蔗

糖、果糖、麦芽糖、乳糖、可溶性淀粉、甘油、甘露醇及 6 种不同的氮源培养基:牛肉膏、蛋白胨、尿素、硝酸铵、硝酸钠、氨基乙酸^[7], 28 ℃ 恒温培养, 每个处理重复 3 次, 测定方法同“1.5.1”节。

1.6 外分泌酶活性检测

参考贾熙超等的方法^[22]将直径为 5 mm 的菌饼接种于蛋白酶检测培养基上, 28 ℃ 恒温培养, 每个处理重复 3 次, 培养 3 d, 观察是否产生透明水解圈; 纤维素酶与淀粉酶的检测分别参考张荷花、蔡鸿杰等的方法^[23-24]并在其基础上加以改进, 如图 1 所示在相应检测培养基上铺 1 层边长为 6 cm 的正方形无菌干燥滤纸片, 再将直径为 5 mm 的菌饼接种于滤纸片中心, 28 ℃ 恒温培养, 每个处理重复 3 次, 培养 3 d, 揭掉滤纸片进行染色观察。纤维素酶检测使用 0.10% 刚果红染液对培养基进行染色, 染色 10 min, 用 1 mol/L NaCl 溶液脱色 2~3 次, 观察是否产生黄色透明的水解圈, 淀粉酶检测使用碘液进行染色, 观察是否产生明显的水解圈。通过测定水

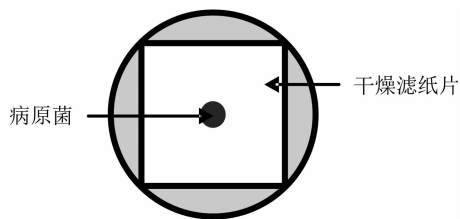
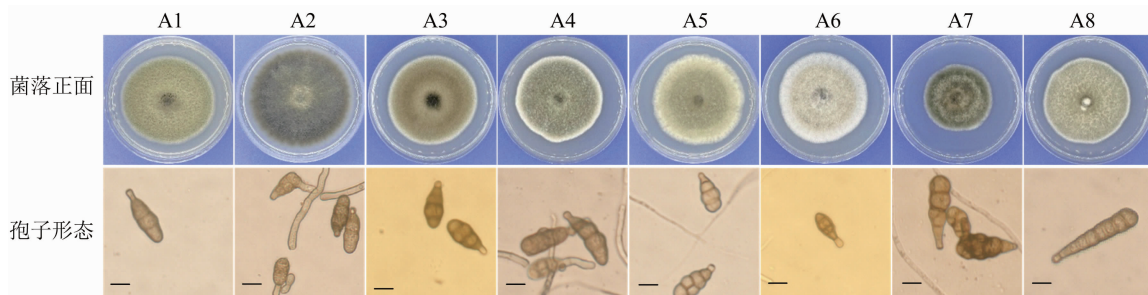


图1 纤维素酶、淀粉酶检测培养基



比例尺=10 μm

图2 不同类型的链格孢属菌株的形态特征

2.2 致病力验证

从 8 个类型中分别选取 1 个代表性菌株进行致病力验证, 接种结果表明, 8 株分离菌株均可使水稻表现出和田间水稻病害相同或相近的症状(图 3), 颖壳上有铁锈色圆形或不规则状的斑点。再次分离收集接种感病稻谷, 和初次分离纯化病原菌的方法一样。再次分离纯化均得到与初接菌株相同的分离物, 符合柯赫氏法则, 证实 8 株分离菌株均为引

解圈大小与菌落直径的关系, 确定各菌株对蛋白质、纤维素和淀粉的分解效率。分解效率 = 水解圈直径/菌落直径 × 100%^[24]。

2 结果与分析

2.1 病原菌分离与形态比较

对采集到的 39 个样本进行分离纯化, 共获得 181 个菌株, 根据分生孢子形态鉴定到链格孢属菌株 151 个, 占 83.43%。选取其中 37 个菌株进行形态学比较, 根据菌落形态, 划分为 8 个类型, 分别记录为 A1~A8。

由图 2 可知, 8 个类型的菌株在 PDA 培养基上菌落生长状态和颜色各不相同, A1 为绿色, A2 为深棕色, A3 为棕色, A4 为灰绿色, A5 中心浅绿色边缘大部分为白色, A6 为白色, A7 为深绿色, A8 为浅绿色。A1、A2、A3、A6 在 PDA 平板上菌落表面平整, 边缘整齐, 菌丝埋生; A4、A5、A7、A8 在 PDA 平板上菌落平展, 棉絮状, 气生菌丝发达; 8 个类型的分生孢子均为淡褐色或褐色, 有横隔和纵隔, 在孢子形态上有差异, A1、A2、A3、A4、A5、A6、A7 分生孢子呈棍棒状或倒梨形, 具有横隔 1~6 个, 纵隔 1~5 个, 分隔处有缢缩, 顶端喙状细胞较短, 圆柱形或锥形; A8 分生孢子呈倒棍棒状, 具有横隔 4~8 个, 纵隔 1~4 个, 横隔分隔处有缢缩, 短喙柱形。

起水稻穗腐病的致病菌。

2.3 分子生物学鉴定

利用真菌通用引物 ITS1/ITS4 对 37 个菌株进行分子鉴定, 同源性比对结果表明, 18 个菌株的 ITS 序列与细交链格孢菌 (*Alternaria tenuissima*) 同源性高达 99.82%, 可确定为细交链格孢菌, 记为 I 类菌; 18 个菌株与链格孢菌 (*Alternaria alternata*) 同源性高达 99.45%, 确定为链格孢菌, 记为 II 类菌; 仅 1

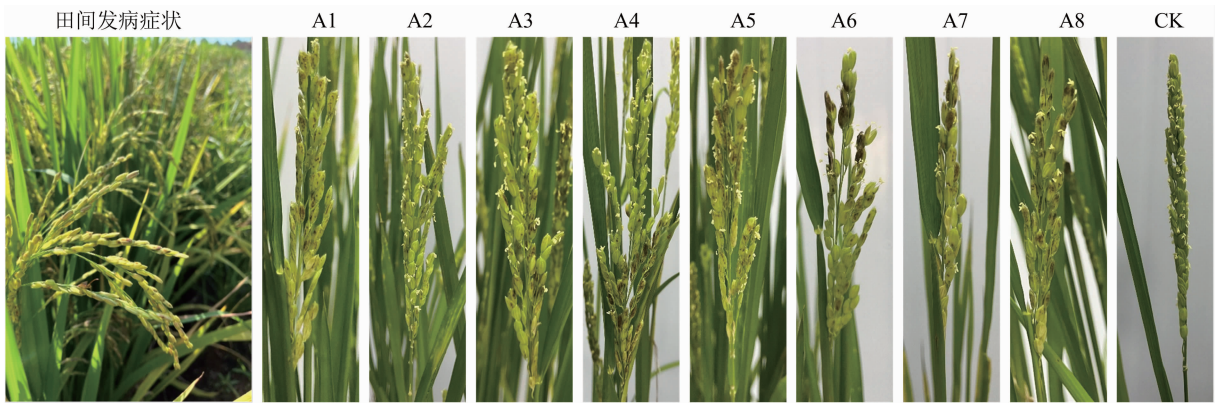


图3 水稻穗腐病田间发病症状及致病性测定结果

个菌株与芸薹链格孢菌 (*Alternaria brassicae*) 同源性高达 100.00%, 确定为芸薹链格孢菌, 记为Ⅲ类菌。其中, 上述接种验证的 8 个菌株, A1 ~ A4 分子鉴定为细交链格孢菌, 属于Ⅰ类菌, A5 ~ A7 为链格孢

菌, 属于Ⅱ类菌, A8 为芸薹链格孢菌, 属于Ⅲ类菌, 这 8 个致病菌与已报道的链格孢菌属的亲缘关系见图 4。

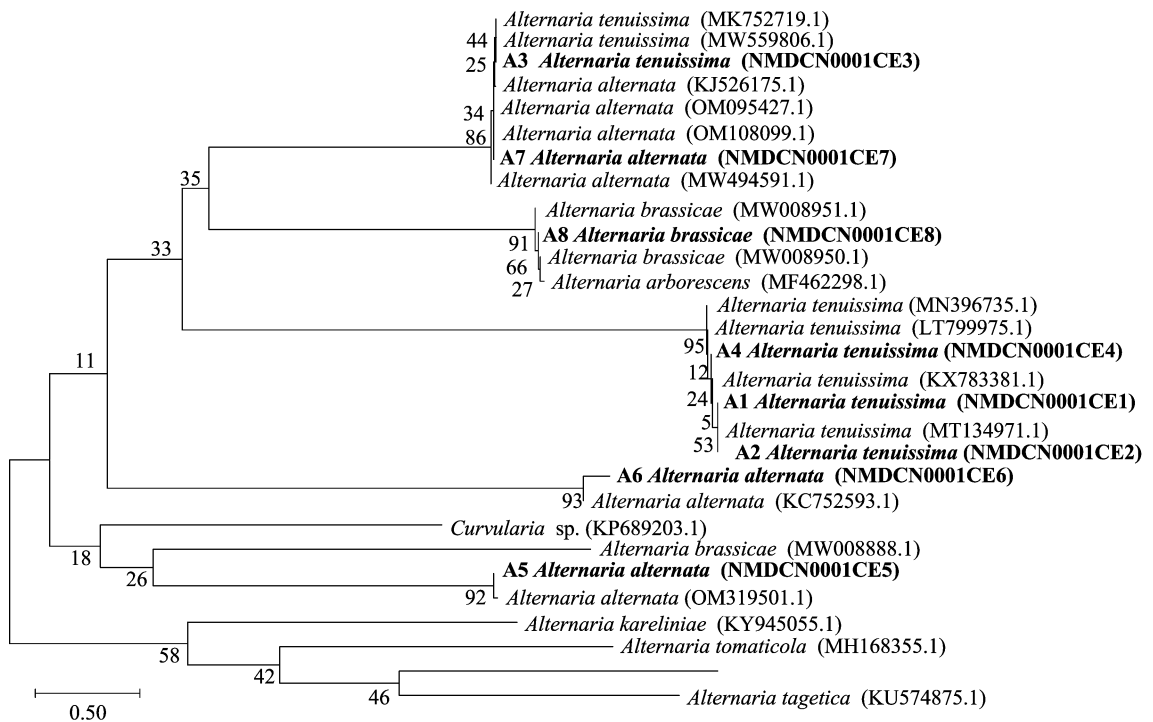


图4 基于 ITS 序列构建 8 个菌株系统发育树

2.4 不同类型链格孢属菌株的生物学特性比较

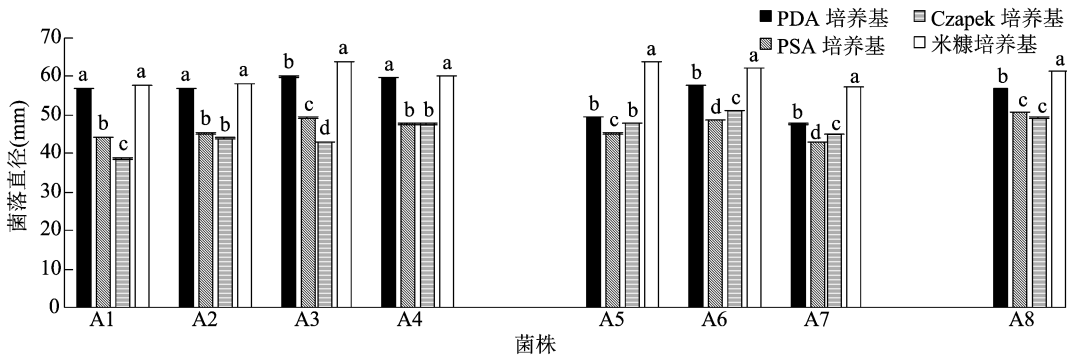
以 A1 ~ A8 这 8 个致病菌作为Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ类菌的代表菌, 比较不同链格孢属菌株的生物学特性。

2.4.1 不同培养基、温度、pH 值对菌丝生长的影响

Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ类菌均能在 PDA、米糠、Czapek、PSA 等 4 种培养基上生长, 但生长速率不同 (图 5)。Ⅰ类菌的最适生长培养基为 PDA 或米糠培养基, 在 Czapek 培养基上的生长速度最慢; Ⅱ类菌和Ⅲ类菌的最适培养基同为米糠培养基, Ⅱ类菌在 PSA 培养

基上菌丝生长最弱; Czapek 培养基不利于Ⅲ类菌的菌丝生长。

Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ类菌均能在 15 ~ 32 ℃ 与 pH 值范围为 5 ~ 12 时生长, 但生长速率有差异 (图 6)。Ⅰ类菌 A1、A2 的菌丝最适生长温度为 26 ℃, 最适 pH 值为 7, A3 的最适生长温度范围为 26 ~ 30 ℃, 最适 pH 值范围为 7 ~ 10, A4 的最适生长温度范围为 28 ~ 30 ℃, pH 值为 9; Ⅱ类菌中 A5 和 A7 的最适生长温度范围为 26 ~ 30 ℃, 最适 pH 值分别为 7、8, A6、A8



柱上不同小写字母表示同一菌株的不同处理在 0.05 水平上差异显著, 图 7 同

图5 不同培养基对不同链格孢属菌株菌丝生长的影响

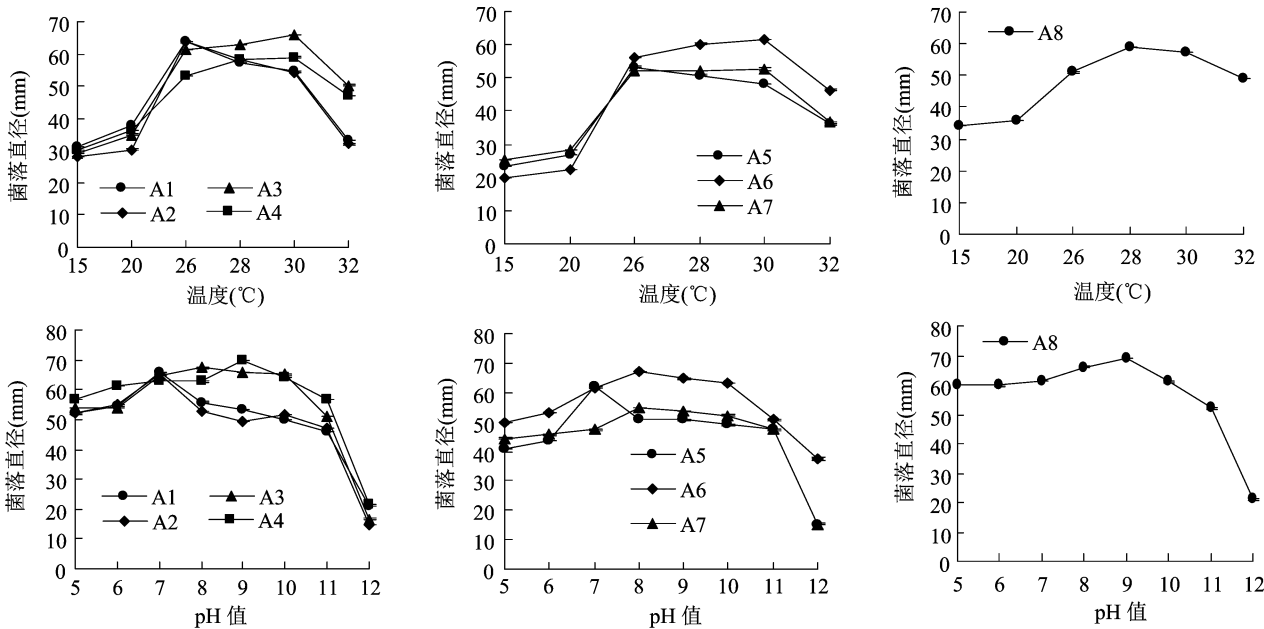


图6 不同温度、pH 值对不同链格孢属菌株菌丝生长的影响

的最适生长温度范围同为 28 ~ 30 ℃, 最适 pH 值范围分别为 8 ~ 10、8 ~ 9。

同一菌种的不同菌株同样存在生物学特性差异(表 1)。Ⅰ类菌中的 4 个菌株在 PDA 培养基上的生长速度存在显著性差异, Ⅱ类菌中的 3 个菌株在最优生长培养基米糠培养基上的生长速度也具有显著性差异; 在最适生长温度范围 26 ~ 30 ℃内, Ⅰ类菌的 4 个菌株在各个温度条件下的生长速度均存在显著性差异, Ⅱ类菌的 3 个菌株在温度为 28、30 ℃时的生长速度存在显著性差异; Ⅰ类菌中的 4 个菌株在最适生长 pH 值范围为 8 ~ 10 时的生长速度存在显著性差异, Ⅱ类菌的 3 个菌株在最适生长 pH 值范围为 7 ~ 10 时的生长速度存在显著性差异。

2.4.2 不同碳、氮源对菌丝生长的影响 Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ类菌在不同的碳、氮源培养基上均可生长, 但生长

速率不同(图 7), Ⅰ类菌不同菌株对不同碳源的利用效率不同, A1 在葡萄糖中生长最快, A2 在葡萄糖、蔗糖、乳糖和麦芽糖中生长较快, 无显著性差异, A3 的最适碳源为甘露醇, A4 在葡萄糖、果糖和可溶性淀粉为碳源的培养基上菌丝生长最快, 无显著性差异。Ⅱ类菌中 A5 的最适碳源为可溶性淀粉, A6 为葡萄糖、A7 为甘露醇。Ⅲ类菌 A8 在以葡萄糖和可溶性淀粉为碳源的培养基上菌丝生长最快, 菌落直径最大。

Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ类菌在以尿素为氮源的培养基上生长最差, A6 在硝酸钠和硝酸铵为氮源的培养基上生长最好, 其他菌株以牛肉膏和蛋白胨为氮源的培养基上菌丝生长最好。

2.4.3 外分泌酶检测结果 在蛋白酶、纤维素酶和淀粉酶检测培养基上均观察到透明水解圈的产生

表 1 同一菌种不同菌株之间的生物学特性比较

项目	培养条件	Ⅰ类菌菌落直径(mm)				Ⅱ类菌菌落直径(mm)		
		A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7
最优培养基	PDA 培养基	57.00b	57.00b	60.00a	59.67a			
	米糠培养基					64.00a	62.33a	57.33b
最适温度范围(℃)	26	63.67a	63.67a	61.33ab	56.00b	53.33a	56.00a	52.00a
	28	57.33b	58.00b	62.67a	58.00b	50.67b	60.33a	52.00b
	30	54.67c	54.00c	65.67a	59.00b	48.33b	61.67a	52.67ab
最适 pH 值范围	7	65.67a	65.00a	64.67a	63.00a	62.00a	61.67a	47.33b
	8	55.67bc	52.67c	67.33a	62.67ab	51.00b	67.33a	54.67b
	9	53.33c	49.33d	65.67b	70.00a	50.67b	64.67a	53.67b
	10	50.00b	51.67b	65.00a	64.00a	49.00b	63.33a	52.33b

注:同行中不同小写字母表示同类菌株间在 0.05 水平上差异显著,下表同。

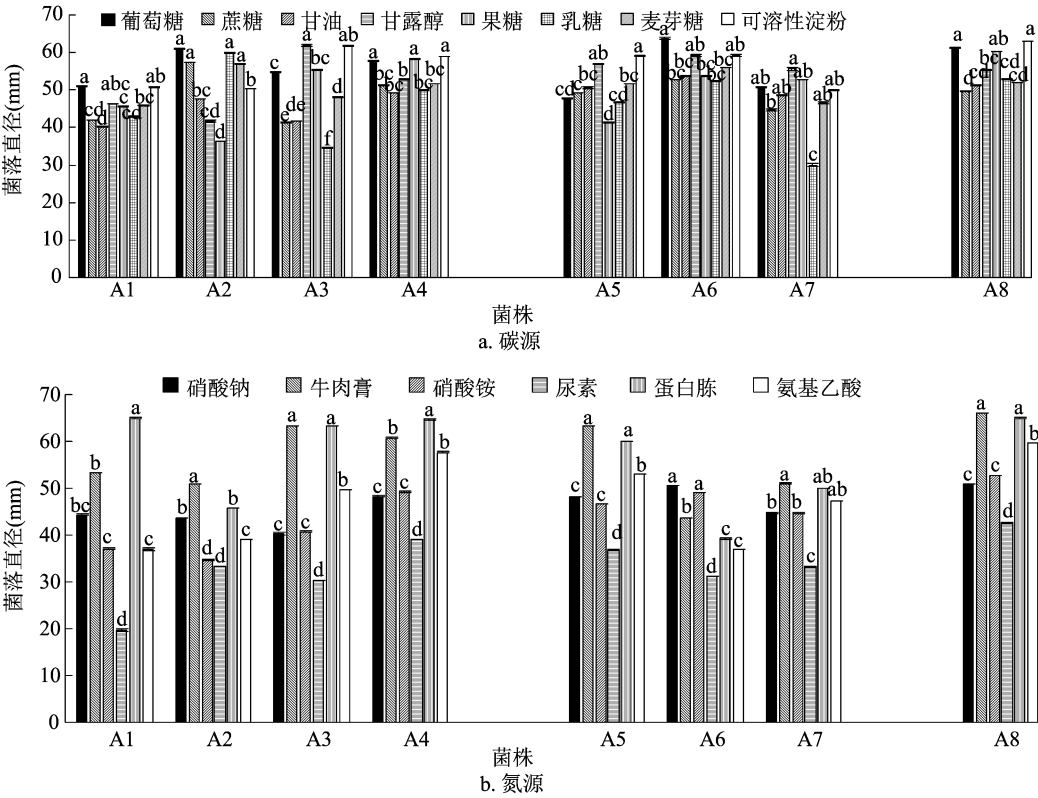
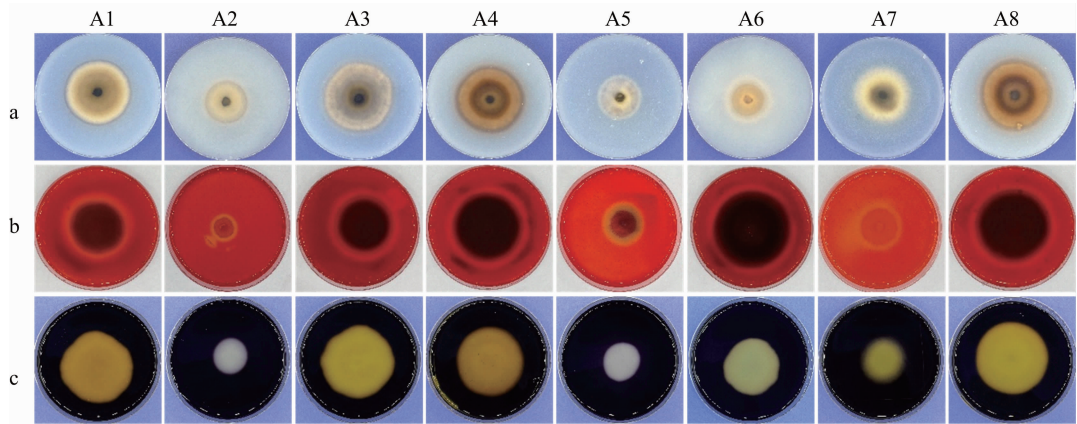


图7 不同碳、氮源对不同类型链格孢属菌株菌丝生长的影响

(图 8),说明 I、Ⅱ、Ⅲ类菌均能产生蛋白酶、纤维素酶及淀粉酶分解利用蛋白质、纤维素和淀粉。菌株对 3 类物质分解效率的测定结果(表 2)表明,Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ类菌对 3 类物质的分解能力存在差异,其中 A1、A3、A5、A8 对纤维素的分解效率最强,分别为 169.14%、151.15%、165.23%、148.22%;A5 对淀粉的分解效率最强,为 169.38%,A1 最差,为 66.04%;A1 对蛋白质的分解效率最强,为 104.53%,A8 最差,为 83.19%。

3 讨论

链格孢属是引起水稻穗腐病的重要病原物,《中国真菌志 第十六卷 链格孢属》^[25] 记录有 123 个种及变种。目前对于链格孢属真菌种的鉴定主要是以形态鉴定为主。本研究在相同条件下分离培养过程中发现 8 类不同生长状态的菌体,通过孢子形态观察其均符合链格孢属形态特征,用通用引物 ITS1/ITS4 进行分子鉴定时,将其分为 3 类,但



a—蛋白酶检测培养基背面；b—纤维素酶检测培养基正面；c—淀粉酶检测培养基正面

图8 不同链格孢属菌株的外分泌酶活性检测

表 2 I、II、III类菌产生的外分泌酶的分解效率

外分泌酶 种类	I 类菌分解效率(%)				II 类菌分解效率(%)			III 类菌分解效率(%)
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
淀粉酶	66.04c	73.08c	119.39b	119.13b	169.38a	116.16a	108.66a	119.21b
纤维素酶	169.14a	128.92a	151.15a	147.09a	165.23b	97.41b	106.71b	148.22a
蛋白酶	104.53b	94.41b	90.87c	84.12c	85.35c	93.25c	87.65c	83.19c

是在构建系统发育树时并没有将 3 类菌完全分在不同分枝上,说明通过核糖体 DNA - ITS 序列分析来确定链格孢属种间分类是有局限性的。

对于黑龙江省链格孢属真菌引起的穗腐病多认为是由链格孢菌引起的^[10],而胡颂平等研究发现新疆省、河南省和江西省水稻穗腐病是由细交链格孢菌引起^[9,26-27]。本研究发现引起黑龙江省水稻穗腐病的链格孢属有 3 种,分别为细交链格孢菌、链格孢菌和芸薹链格孢菌,均是黑龙江省水稻穗腐病的致病菌。其中细交链格孢菌和链格孢菌为该病害主要致病菌,均占链格孢属总数的 48.65%,仅分离得到 1 株芸薹链格孢菌。

本试验将分属于 3 类不同菌种的 8 个代表菌株进行生物学特性研究。结果表明,温度、pH 值、培养基和碳、氮源等不同条件对 3 类菌的菌丝生长均有显著影响。本研究还发现,同一类菌在同一条件下的生长情况不同,如 I 类菌中 A3 和 A4 的最适生长温度范围分别为 26 ~ 30 ℃、28 ~ 30 ℃,A1 和 A2 的最适温度为 26 ℃,与黄世文等研究的细交链格孢菌最适温度范围为 25 ~ 28 ℃^[2] 存在差异。I 类菌中 A3 的最适培养基为米糠培养基,其余 3 个菌株的最适培养基均是 PDA 和米糠培养基,这暗示着同一菌属的不同菌种生物学特性存在差异。本研究还发现,同一菌种不同菌株在同一类型的培养基中生长速度存在显著差异,且对 pH 值、温度的需求亦存在

差异,暗示着同一菌种不同菌株同样存在生物学特性的差异,然而这种种间以及种内的生物学特性差异是否与致病力有相关性需进一步研究论证。8 个菌株的最适碳源为葡萄糖和可溶性淀粉,氮源为牛肉膏和蛋白胨,这与胡颂平等报道的适合细交链格孢菌生长的碳源^[9]一致,与其报道的最适氮源存在差异。

在与寄主互作过程中,病原微生物产生的外分泌酶对成功侵染寄主具有重要的作用^[28]。纤维素是植物细胞壁的主要成分,是阻碍病原物侵染的第一道屏障^[29-32]。淀粉是水稻籽粒重要的营养成份,水稻抽穗后进入灌浆期,这一时期颖壳内会产生大量的淀粉,从而为病原菌提供了良好的营养条件;候恩庆等研究发现,凡是这一时期利用淀粉进行繁殖的植物病原菌,几乎都能使谷粒感病^[33]。本研究发现,8 个致病菌生长最佳碳源为可溶性淀粉,且均能产生淀粉酶和纤维素酶,这 2 种酶的产生可能是链格孢属菌株重要的致病机制。本研究发现不同菌株产生的淀粉酶及纤维素酶总量或活性存在显著差异,是否与致病力具有相关性需要进一步通过接种验证。

有趣的是,本研究从水稻穗腐病病样中分离得到 1 株致病菌芸薹链格孢菌(A8),该菌种为十字花科黑斑病的主要致病菌^[34],关于芸薹链格孢菌侵染水稻的报道尚未见报道。A8 经淀粉酶活性检测发现能产生淀粉酶分解利用淀粉,这可能是因为芸薹链格孢菌能利用淀粉进行繁殖从而使植株感病,后续将通

过分离鉴定更多的链格孢属菌株来验证这一假设。

4 结论

黑龙江省水稻主产区穗腐病的致病菌为链格孢属菌株,其中细交链格孢菌、链格孢菌为优势菌种,均占菌株数量的 48.65%,只有 1 株为芸薹链格孢菌。水稻穗腐病病原菌的菌丝生长受培养基、温度、pH 值和碳、氮源的影响,其中温度和碳、氮源的影响较突出。不同的生理小种在不同的碳、氮源培养基上菌丝生长速率存在差异,较适合所有菌株菌丝生长的碳源为葡萄糖和可溶性淀粉,氮源为牛肉膏和蛋白胨。8 个菌株均能分泌 3 种外分泌酶。分析结果表明,链格孢菌属不同菌种存在生物学特性差异,同一菌种的不同菌株也存在生物学特性差异。

参考文献:

- [1] 李 路,刘连盟,王国荣,等. 水稻穗腐病和穗枯病的研究进展[J]. 中国水稻科学,2015,29(2):215-222.
- [2] 黄世文,王 玲,刘连盟,等. 水稻穗腐病病原分离、鉴定及生物学特性[J]. 中国水稻科学,2012,26(3):341-350.
- [3] 蒋兴方,周 成,王艳秋,等. 上海市松江区水稻穗腐病药剂防治试验[J]. 浙江农业科学,2020,61(3):460-462,464.
- [4] Lee F N, Tugwell N P, Fannah S J, et al. Role of fungi vectored by rice stink bug (Heteroptera: Pentatomidae) in discoloration of rice kernels[J]. Journal of Economic Entomology, 1993, 86(2):549-556.
- [5] Huang S W, Wang L, Liu L M, et al. Rice spikelet rot disease in China - 1. Characterization of fungi associated with the disease[J]. Crop Protection, 2011, 30(1):1-9.
- [6] Ou S H. Rice diseases [M]. 2nd ed. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1985.
- [7] 张俊华,李云鹏,韩雨桐,等. 黑龙江省水稻褐变穗病病原鉴定及生物学特性研究[J]. 东北农业大学学报,2018,49(1):27-38,46.
- [8] 费 丹,檀根甲,罗道宏. 安徽省水稻穗腐病病原鉴定及生物学特性研究[J]. 安徽农业大学学报,2014,41(5):777-782.
- [9] 胡颂平,余 建,魏开发,等. 江西水稻穗腐病病原菌鉴定及生物学特性研究[J]. 江西农业大学学报,2019,41(2):234-242.
- [10] 穆娟微,李 鹏,李德萍. 水稻新病害——水稻褐变穗[J]. 现代化农业,2005(10):1-2.
- [11] 台莲梅,姜小玉,靳学慧,等. 黑龙江省水稻褐变病病原菌的分离与鉴定[J]. 微生物学通报,2020,47(6):1776-1786.
- [12] 张晓娟,张 羽,胡胜武. 油菜菌核病抗性机理及抗病遗传育种研究进展[J]. 分子植物育种,2016,14(3):704-711.
- [13] Eshel D, Miyara I, Tong A L, et al. pH regulates endoglucanase expression and virulence of *Alternaria alternata* in persimmon fruit [J]. Molecular Plant - Microbe Interactions, 2002, 15(8):774-779.

- [14] 王盈桐,李学威,陆云彪,等. 苦菜、茵陈内生真菌的分离鉴定与生物活性[J]. 江苏农业科学,2020,48(20):265-270.
- [15] 龚国淑,徐 琴,张 敏,等. 一种简便的病原真菌单孢分离方法研究[J]. 玉米科学,2010,18(1):126-127,134.
- [16] 尹良芬. 滤纸片低温干燥法保存丝状真菌[J]. 安徽农业科学,2022,50(12):5-10.
- [17] 孙 磊,王 玲,刘连盟,等. 水稻穗腐病菌强致病力且高产伏马菌素菌株筛选[J]. 中国水稻科学,2018,32(6):610-616.
- [18] Edwards K, Johnstone C, Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis [J]. Nucleic Acids Research, 1991, 19(6):1349.
- [19] White T J, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [M]// PCR Protocols. Amsterdam: Elsevier, 1990:315-322.
- [20] 田守波,朱为民,朱龙英,等. 番茄棒孢叶斑病病原鉴定及生物学特性研究[J]. 植物保护,2020,46(3):157-162,166.
- [21] 杨小林,韩 烨,殷得所,等. 湖北稻区穗腐病病原 ITS 鉴定及其生物学特性分析[J]. 河南农业科学,2019,48(4):82-87.
- [22] 贾熙超,杨淑珂,孙红炜,等. 棉花枯萎病生防菌的筛选及其抑菌机理初探[J]. 山东农业科学,2021,53(2):94-101,105.
- [23] 张荷花. 致病疫霉诱导细菌 W-7 产生纤维素酶发挥抑菌作用 [D]. 保定:河北大学,2020.
- [24] 蔡鸿杰,李卫春,侯世洁,等. 植酸酶分泌菌株的筛选研究[J]. 天津师范大学学报(自然科学版),2006,26(2):19-22.
- [25] 张天宇. 中国真菌志 第十六卷 链格孢属 [M]. 北京:科学出版社,2003.
- [26] 马 盾,王孝荣,王奉斌,等. 新疆水稻穗腐病综合防控技术 [J]. 中国稻米,2019,25(2):108-110.
- [27] 陈利军,王春生,田雪亮,等. 河南信阳地区水稻穗腐病病原多样性 [C]//彭友良,王文明,陈学伟,等. 中国植物病理学会 2019 年学术年会论文集. 成都:中国植物病理学会,2019:238.
- [28] Sudo T, Nagayama H, Tamari K. Occurrence and some properties of cellulase in the filtrates of conidiospores and mycelia of *Pyricularia oryzae* Cavara [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1973, 37(7):1651-1659.
- [29] 陈贵华,王 萍,石 岭. 细胞壁在植物抗病反应中的能动作用研究进展[J]. 内蒙古农业大学学报(自然科学版),2021,42(5):117-120.
- [30] Kozieł E, Otulak - Kozieł K, Bujarski J J. Plant cell wall as a key player during resistant and susceptible plant - virus interactions [J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12:656809.
- [31] Pogorelko G, Lionetti V, Bellincampi D, et al. Cell wall integrity: targeted post - synthetic modifications to reveal its role in plant growth and defense against pathogens [J]. Plant Signaling & Behavior, 2013, 8(9):e25435.
- [32] 师莹莹,李大勇,张慧娟,等. 植物细胞壁介导的抗病性及其分子机制[J]. 植物生理学报,2011,47(7):661-668.
- [33] 侯恩庆,张佩胜,王 玲,等. 水稻穗腐病菌致病性、发生规律及防控技术研究[J]. 植物保护,2013,39(1):121-127,120.
- [34] 杨冠美,郑永利,吴华新,等. 9 种杀菌剂对芸薹生链格孢菌毒力的测定[J]. 浙江农业科学,2011,52(3):665-669.