

调 查 研 究

Investigations

安徽省玉米穗腐病主要致病镰孢菌的分离与鉴定

魏 琪, 廖露露, 陈 莉, 齐永霞*

(安徽农业大学植物保护学院, 合肥 230036)

摘要 为明确安徽省玉米穗腐病主要致病镰孢菌的种类,采用单孢分离、形态学鉴定和分子生物学鉴定的方法,对2017年采集自安徽省6个玉米主产区——合肥市、蚌埠市、淮北市、阜阳市、亳州市和宿州市的玉米穗腐病病样进行了分离鉴定。在获得的455株镰孢菌中,拟轮枝镰孢菌、禾谷镰孢复合种、层出镰孢菌、尖孢镰孢菌和黄色镰孢菌的分离频率分别为59.13%、21.28%、13.68%、5.12%和0.79%。其中拟轮枝镰孢菌在各地的分布最广,属于安徽省的优势致病镰孢菌。

关键词 玉米; 穗腐病; 镰孢菌

中图分类号: S 435.131 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2018362

Isolation and identification of main *Fusarium* species causing maize ear rot in Anhui province

WEI Qi, LIAO Lulu, CHEN Li, QI Yongxia

(College of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract In order to clarify the major pathogenic *Fusarium* species of maize ear rot in Anhui province, the samples were collected from six main maize regions of Hefei, Bengbu, Huaibei, Fuyang, Bozhou and Suzhou in 2017, and the pathogen was isolated and identified by single spore isolation, morphological and molecular identification. Among the 455 isolates of *Fusarium*, the isolation frequencies of *Fusarium verticillioides*, *F. graminearum* species complex, *F. proliferatum*, *F. oxysporum* and *F. culmorum* were 59.13%, 21.28%, 13.68%, 5.12% and 0.79%, respectively. The results showed that *F. verticillioides* was the most widely distributed and was the main pathogenic *Fusarium* species in Anhui province.

Key words maize; ear rot; *Fusarium* spp.

玉米是我国重要的粮食作物,同时也是重要的工业原料和畜牧饲料,而玉米穗腐病一直是玉米生产上的重要病害。玉米穗腐病由多种病原菌感染引起。有研究表明,在我国引起玉米穗腐病的主要致病菌为镰孢菌,其次还有青霉、曲霉、木霉等,其中拟轮枝镰孢 *Fusarium verticillioides* 和禾谷镰孢复合种 *F. graminearum* species complex 为广泛分布的优势致病种类^[1]。由于地理位置、气候条件等的不同,各地引起玉米穗腐病的镰孢菌种类也有所不同。重庆地区玉米穗腐病优势致病镰孢菌为拟轮枝镰孢、禾谷镰孢复合种和层出镰孢^[2]。甘肃省和辽宁省的优势致病镰孢菌为拟轮枝镰孢^[3-4]。黄淮海夏

玉米主产区玉米穗腐病优势病原菌为拟轮枝镰孢、禾谷镰孢复合种和木霉^[5]。目前,尚未见有关安徽省玉米穗腐病主要致病镰孢菌的系统报道。因此本试验从安徽省主要玉米生产区采集病样,通过形态学和分子生物学方法对致病镰孢菌进行分离鉴定,为安徽省玉米穗腐病的综合防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

玉米穗腐病病样的采集:2017年从安徽省6个玉米主产区——合肥市、蚌埠市、淮北市、阜阳市、亳州市和宿州市共采集玉米穗腐病病样226份,所有

收稿日期: 2018-08-21 修订日期: 2018-11-05

基金项目: 粮食丰产增效科技创新专项(2017YFD0301301)

* 通信作者 E-mail: superpowerqyx@163.com

病样均用纸袋包好带回实验室进行分离鉴定。

供试培养基:马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基;合成低营养琼脂(spezieller nährstoffarmer agar, SNA)培养基;水琼脂(water agar, WA)培养基。

试剂:2×Taq Plus Master Mix、100 bp Plus DNA Ladder、5 U Taq DNA 聚合酶、10×Buffer、2.5 mmol/L dNTPs,宝日医生物技术(北京)有限公司;镰孢属/种的特异性引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 玉米穗腐镰孢菌的单孢分离

从发病玉米穗上随机挑取 30 个籽粒,置于 3% NaClO 溶液中,浸泡消毒 2 min,再放入 75%乙醇中停留 10 s,快速取出放入无菌水中清洗,置于灭菌滤纸上吸干水分。随机夹取玉米籽粒均匀放置在加有链霉素的 PDA 平板上,置于 25℃培养箱中黑暗培养,待籽粒周围长出菌丝后,挑取菌丝置于新的 PDA 平板上进行纯化培养,4~7 d 后观察形态。将疑似镰孢菌的菌株进行单孢分离,挑取部分菌丝置于 1.0 mL 无菌水中,通过连续稀释,配制成终浓度为 1 个/μL 的孢子悬浮液,吸取 30 μL 于 SNA 平板上,均匀涂板,置于 25℃下培养 48 h,挑取单菌落于新的 SNA 平板上再培养 4~5 d,即获得单孢纯培养菌株^[6]。镰孢菌分离频率的计算公式如下:

各属真菌的分离频率=携带各属真菌的玉米籽粒数/总玉米籽粒数×100%;

各种镰孢菌分离频率=同种镰孢菌株数/镰孢菌总株数×100%。

1.2.2 玉米穗腐镰孢菌的鉴定

将单孢纯培养的菌株分别接种到加有抗生素的 PDA 和 SNA 平板上,4 d 后测量菌落直径并计算生长速率,7 d 后观察菌株在 PDA 培养基上的菌落形态、颜色变化以及在 SNA 培养基上的孢子形态、大小、着生方式等特点。参考 Booth 和 Leslie 等的镰孢菌形态学鉴定方法^[7-8],初步确定镰孢菌的种类。

对初步鉴定为拟轮枝镰孢、禾谷镰孢复合种、层出镰孢、尖孢镰孢和黄色镰孢的菌株,通过镰孢菌基因组 DNA 小量制备的方法提取菌株 DNA。将所提 DNA 先用镰孢属引物 Its F/R(表 1)进行 PCR 扩增,电泳结果符合 431 bp 目的条带的即为镰孢菌。再将符合目的条带的菌株用各类镰孢菌特异性引物

(表 1)进行 PCR 扩增,进一步确定镰孢菌的种类。

50 μL PCR 反应体系为:DNA 1.0 μL、5U Taq DNA 聚合酶 0.5 μL、10×Buffer 5.0 μL、2.5 mmol/L dNTPs 4.0 μL、上下游引物各 2.0 μL,ddH₂O 补足至 50.0 μL。

PCR 扩增程序为:94℃预变性 5 min,94℃变性 40 s,55~59℃退火 40 s(各引物退火温度不同,详见表 1),72℃延伸(延伸时间视 DNA 片段大小而定,1 000 bp/min),35 个循环,72℃再次延伸 7 min。

对于上述方法未鉴定到种的镰孢菌菌株,利用引物 TEF-1αF/R(表 1)进行 PCR 扩增,扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后符合目的条带的送去生工生物工程(上海)股份有限公司测序。将测序结果在 NCBI 网站上进行 BLAST 比对,确定镰孢菌的种类。25.0 μL PCR 反应体系为:DNA 2.0 μL、2×Taq Plus Master Mix 12.5 μL、TEF1αF/R 各 1.0 μL,ddH₂O 补足至 25.0 μL。PCR 扩增程序为:95℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,55℃退火 1 min,72℃延伸 42 s,35 个循环;72℃再次延伸 10 min。

2 结果与分析

2.1 玉米穗腐病原菌的分离

从安徽省 6 个地区采集的 226 份玉米穗腐病病样中共分离获得 5 个属 680 个菌株,包括镰孢属、青霉属、腐霉属、木霉属和曲霉属。其中镰孢属共分离获得 455 株,经柯赫氏法则验证 455 个菌株均具有致病性。在分离的 680 个菌株中,镰孢属的分离频率为 66.91%,是安徽省玉米穗腐病的优势致病菌。青霉属、腐霉属、曲霉属和木霉属的分离频率较低,分别为 15.15%、7.92%、7.12%和 2.90%。

2.2 玉米穗腐镰孢菌的鉴定

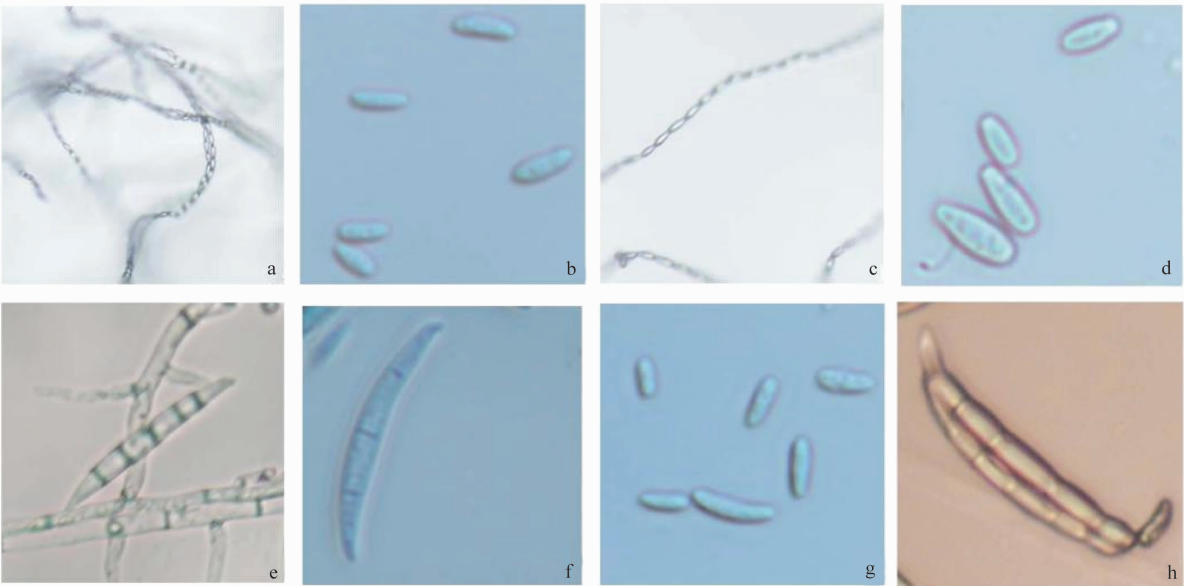
通过观察菌株在 PDA 培养基上的色素变化和生长速率以及在 SNA 培养基上的大型分生孢子和小型分生孢子等的形态特征,初步确定镰孢菌的种类(图 1)。

将初步鉴定为镰孢菌的菌株 DNA 用镰孢属引物 Its F/R 进行 PCR 扩增,结果表明有 455 个菌株能扩增出 431 bp 的目标片段。再用种特异性引物对以上菌株 DNA 分别进行 PCR 扩增,根据片段大小确定镰孢菌的种类(图 2)。未扩增出任何目标片段的菌株,使用 TEF-1αF/R 引物对其进行 PCR 扩增,经基因测序并进行 BLAST 比对,最终结果表明

有 269 株为拟轮枝镰孢,97 株为禾谷镰孢复合种, 5.05%和 0.88%(表 2)。因此拟轮枝镰孢为安徽省 62 株为层出镰孢,23 株为尖孢镰孢,4 株为黄色镰 玉米穗腐病的优势致病镰孢菌,广泛分布在安徽省 孢,其分离频率分别为 59.12%、21.32%、13.63%、 各玉米种植区。

表 1 镰孢菌特异性引物序列
Table 1 Specific primer pairs for *Fusarium* species

镰孢菌 <i>Fusarium</i> species	引物 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequence	扩增片段/bp Product size	退火温度/℃ Tm	文献 Reference
镰孢属 <i>Fusarium</i> spp.	Its F Its R	AACTCCCAAACCCCTGTGAACATA TTTAACGGCGTGGCCGC	431	58	[9]
拟轮枝镰孢 <i>F. verticillioides</i>	VER1 VER2	CTTCCTGCGATGTTTCTCC AATTGGCCATTGGTATTATATATCTA	578	56	[10]
禾谷镰孢复合种 <i>F. graminearum</i> species complex	Fg16NF Fg16NR	ACAGATGACAAGATTCAAGCACA TTCTTTGACATCTGTTCAACCCA	280	57	[12]
层出镰孢 <i>F. proliferatum</i>	PRO1 PRO2	CTTTCCGCCAAGTTTCTTC TGTCAGTAACTCGACGTTGTTG	585	56	[10]
尖孢镰孢 <i>F. oxysporum</i>	FoF1 FoR1	ACATAACCACTTGTGCGCTCG CGCCAATCAATTTGAGGAACG	340	58	[11]
黄色镰孢 <i>F. culmorum</i>	Fc01F Fc01R	ATGGTGAACTCGTCTGGC CCCTTCTTACGCCAATCTCG	570	59	[12]
转录延伸因子-1α TEF-1α	TEF-1αF TEF-1αR	ATGGGTAAGGAGGACAAGAC GGAAGTACCAGTGATCATGTT	700	55	[13]



a-b: 层出镰孢; c~d: 拟轮枝镰孢; e: 禾谷镰孢复合种; f-g: 尖孢镰孢; h: 黄色镰孢
a-b: *F. proliferatum*; c-d: *F. verticillioides*; e: *F. graminearum* species complex; f-g: *F. oxysporum*; h: *F. culmorum*

图 1 镰孢菌孢子形态(×200)

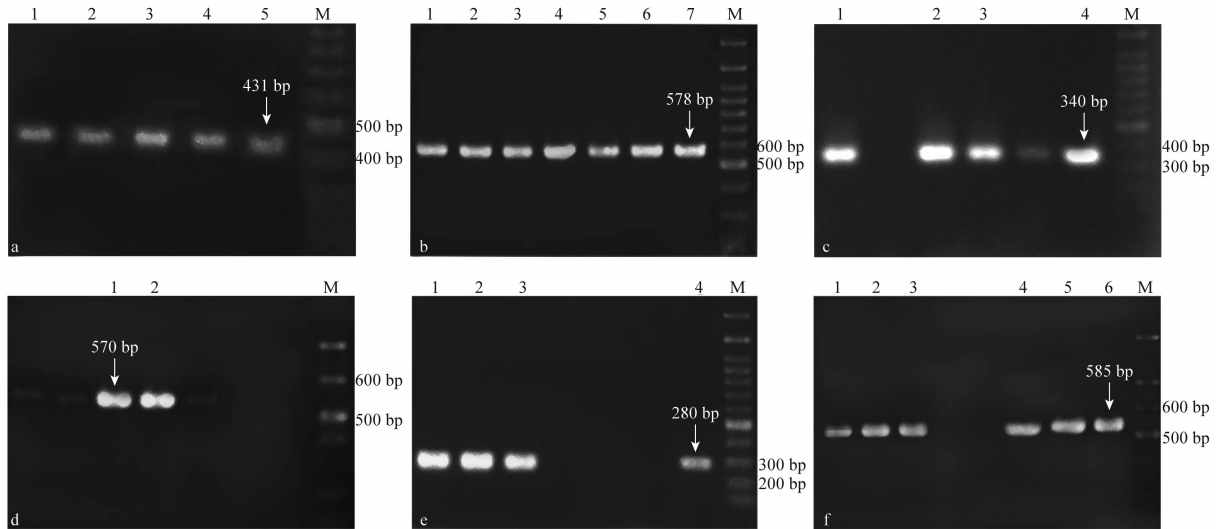
Fig. 1 Spore morphology of *Fusarium* species(×200)

2.3 不同地区间镰孢菌的分布

从安徽省 6 个玉米主产区共分离鉴定出 455 株 穗腐镰孢菌,其中合肥市 80 株,蚌埠市 81 株,淮北市 74 株,阜阳市 64 株,亳州市 82 株,宿州市 74 株。拟 轮枝镰孢是 6 个地区的优势致病镰孢菌,其在合肥 市、蚌埠市、淮北市、阜阳市、亳州市、宿州市的分离频率

分别为 51.25%、45.68%、43.24%、78.13%、74.39%和 64.86%。其次为禾谷镰孢复合种,其在合肥市、蚌埠 市、淮北市、阜阳市、亳州市、宿州市的分离频率分别 为 17.50%、14.81%、18.92%、21.88%、23.17%和 32.43%。除阜阳市外,层出镰孢菌在其他 5 个地区 均分离到,且主要分布于合肥市、蚌埠市和淮北市。

尖孢镰孢菌只在合肥市、蚌埠市和淮北市分离到,而黄色镰孢菌仅在合肥市分离到(表 2)。综上所述,拟轮枝镰孢和禾谷镰孢复合种为安徽省玉米穗腐病的主要致病镰孢菌,且拟轮枝镰孢为优势种。



a: 镰孢属; b: 拟轮枝镰孢; c: 尖孢镰孢; d: 黄色镰孢; e: 禾谷镰孢复合种; f: 层出镰孢
a: *Fusarium* spp.; b: *F. verticillioides*; c: *F. oxysporum*; d: *F. culmorum*; e: *F. graminearum* species complex; f: *F. proliferatum*

图 2 镰孢菌 PCR 鉴定

Fig. 2 Molecular identification of *Fusarium* species by PCR amplification

表 2 安徽省不同地区玉米穗腐镰孢菌的分离频率

Table 2 Isolation frequencies of *Fusarium* species in Anhui province

地区 Region	拟轮枝镰孢 <i>F. verticillioides</i>		禾谷镰孢复合种 <i>F. graminearum</i> species complex		层出镰孢 <i>F. proliferatum</i>		尖孢镰孢 <i>F. oxysporum</i>		黄色镰孢 <i>F. culmorum</i>		总株数 Total
	株数 No.	分离频率/% Frequency	株数 No.	分离频率/% Frequency	株数 No.	分离频率/% Frequency	株数 No.	分离频率/% Frequency	株数 No.	分离频率/% Frequency	
合肥 Hefei	41	51.25	14	17.50	12	15.00	9	11.25	4	5.00	80
蚌埠 Bengbu	37	45.68	12	14.81	20	24.69	12	14.81	0	0.00	81
淮北 Huaibei	32	43.24	14	18.92	26	35.14	2	2.70	0	0.00	74
阜阳 Fuyang	50	78.13	14	21.88	0	0.00	0	0.00	0	0.00	64
亳州 Bozhou	61	74.39	19	23.17	2	2.44	0	0.00	0	0.00	82
宿州 Suzhou	48	64.86	24	32.42	2	2.70	0	0.00	0	0.00	74

3 讨论

玉米穗腐病的致病菌有多种,其中镰孢菌为全球大部分地区玉米穗腐病的主要致病菌。在美国、加拿大、阿根廷和巴西的玉米种植区,穗腐病的主要致病菌为镰孢菌^[13-15]。在我国大部分地区,如重庆、辽宁、甘肃、山西和陕西等地,玉米穗腐病的主要致病菌也为镰孢菌^[1-4]。本研究结果显示,从安徽省 6 个地区采集的玉米病样中,镰孢菌的分离比例最高,为安徽省玉米穗腐病的优势病原菌。

通过对安徽省玉米穗腐病病样中 455 株镰孢属菌株进行分离鉴定,结果显示拟轮枝镰孢菌的分离频率为 59.12%,为安徽省最主要的玉米穗腐致病镰孢菌。这与我国大部分地区的鉴定结果一致,有

研究表明拟轮枝镰孢在东北和华北地区的分离频率也较高^[1]。在我国西北地区的甘肃省,玉米穗腐病的优势致病菌为拟轮枝镰孢和黄色镰孢^[16]。在西南地区的重庆,拟轮枝镰孢、层出镰孢和禾谷镰孢复合种是主要致病镰孢^[2]。各地镰孢菌的分离频率存在差异,这与气候条件密切相关,有研究表明干热的环境有利于拟轮枝镰孢和层出镰孢的侵染^[17-18]。据中国天气网安徽站的数据显示,2017 年安徽省夏季高温持续时间很长,这可能是拟轮枝镰孢分离频率最高的原因之一。此外拟轮枝镰孢的传播途径多样,特别是可通过种子运输传播,使其在各地分布广泛^[19]。

玉米穗腐病一直是玉米上的重要病害,通过对安徽省主要玉米生产区穗腐病病样的分离鉴定,确

定安徽省玉米穗腐病的主要致病菌为镰孢菌,对于选育抗病品种,防治病害具有重要意义。

参考文献

- [1] 秦子惠,任旭,江凯,等. 中国玉米穗腐病致病镰孢种群及禾谷镰孢复合种的鉴定[J]. 植物保护学报,2014,41(5):589-596.
- [2] 周丹妮,王晓鸣,李丹丹,等. 重庆及周边地区玉米穗腐病致病镰孢菌的分离与鉴定[J]. 植物保护学报,2016,43(5):782-788.
- [3] 郭聪聪,朱维芳,付萌,等. 甘肃省玉米籽粒中镰孢菌分离频率及伏马毒素含量监测[J]. 植物保护学报,2015,42(6):942-948.
- [4] 肖淑芹,许佳宁,闫丽斌,等. 辽宁省玉米镰孢穗腐病原菌的鉴定与分布[J]. 植物保护学报,2017,44(5):803-808.
- [5] 孙华,张海剑,郭宁,等. 黄淮海夏玉米主产区穗腐病原菌的分离鉴定[J]. 植物保护学报,2017,44(5):796-802.
- [6] 张昊,张争,许景升,等. 一种简单快速的赤霉病菌单孢分离方法—平板稀释划线分离法[J]. 植物保护,2008,34(6):134-136.
- [7] BOOTH C. The genus *Fusarium* [M]. Kew, Surrey, UK: Commol/Lon-wealth Mycological Institute, 1971.
- [8] LESLIE J F, SUMMERELL B A. The *Fusarium* laboratory manual [M]. Ames (IA): Blackwell Publishing, 2006.
- [9] BLUHM B H, FLAHERTY J E, COUSIN M A, et al. Multiplex polymerase chain reaction assay for the differential detection of trichothecene- and fumonisin-producing species of *Fusarium* in cornmeal [J]. Journal of Food Protection, 2002, 65 (12): 1955-1961.
- [10] MULÈ G, SUSCA A, STEA G, et al. A species-specific PCR assay based on the calmodulin partial gene for identification of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. subglutinans* [J]. European Journal of Plant Pathology, 2004, 110(5/6): 495-502.
- [11] MISHRA P K, FOX R T V, CULHAM A. Development of a PCR-based assay for rapid and reliable identification of patho-

genic *Fusaria* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2003, 218(2): 329-332.

- [12] NICHOLSON P, SIMPSON D R, WESTON G, et al. Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1998, 53(1): 17-37.
- [13] SCHAAFSMA A W, LIMAY-RIOS V, TAMBURIC-ILLINCIC L. Mycotoxins and *Fusarium* species associated with maize ear rot in Ontario, Canada [J]. Cereal Research Communications, 2008, 36: 525-527.
- [14] SAMPIETRO D A, DIAZ C G, GONZALEZ V, et al. Species diversity and toxigenic potential of *Fusarium graminearum* complex isolates from maize fields in northwest Argentina [J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 145(1): 359-364.
- [15] STUMPF R, DOS SANTOS J, GOMES L B, et al. *Fusarium* species and fumonisins associated with maize kernels produced in Rio Grande do Sul State for the 2008/09 and 2009/10 growing seasons [J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2013, 44(1): 89-95.
- [16] 郭成,魏宏玉,郭满库,等. 甘肃玉米穗腐病病样中轮枝镰孢菌的分离鉴定及生物学特性[J]. 植物病理学报,2014,44(1): 17-25.
- [17] BOTTALICO A. *Fusarium* diseases of cereals: species complex and related mycotoxin profiles, in Europe [J]. Journal of Plant Pathology, 1998, 80(2): 85-103.
- [18] LOGRIECO A, MULÈ G, MORETTI A, et al. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe [J]. European Journal of Plant Pathology, 2002, 108(7): 597-609.
- [19] 任旭,朱振东,李洪杰,等. 轮枝镰孢 SSR 标记开发及在玉米分离群体遗传多样性分析中的应用[J]. 中国农业科学,2012,45(1): 52-66.

(责任编辑: 杨明丽)

(上接 206 页)

- [10] ZHANG Jingsong, ZHAO Nana, LIU Qizhi, et al. Repellent constituents of essential oil of *Cymbopogon distans* aerial parts against two stored-product insects [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2011, 59: 9910-9915.
- [11] HASSANPOURAGHDAM M B. Flowerhead volatile oil composition of soilless culture-grown *Chrysanthemum balsamita* L. [J]. Natural Product Research, 2009, 23(7): 672-677.
- [12] MARONGIU B, PIRAS A, PORCEDDA S, et al. Chemical and biological comparisons on supercritical extracts of *Tanacetum cinerarii folium* (Trevir) Sch. Bip. with three related species of chrysanthemums of Sardinia (Italy) [J]. Natural Product Research, 2009, 23(2): 190-199.
- [13] WANG Ying, YOU Chenxue, YANG Kai, et al. Bioactivity of essential oil of *Zingiber purpureum* Rhizomes and its main compounds against two stored product insects [J]. Journal of

Economic Entomology, 2015, 108(3): 925-932.

- [14] WANG Ying, YOU Chunxue, WANG Chengfang, et al. Chemical constituents and insecticidal activities of the essential oil from *Amomum tsaoko* against two stored-product insects [J]. Journal of Oleo Science, 2014, 63(10): 1019-1026.
- [15] 吴彦,张文娟,李志华,等. 侧柏叶对烟草仓储害虫烟草甲和赤拟谷盗的毒杀作用[J]. 烟草科技, 2015, 48(10): 31-35.
- [16] YANG Kai, WANG Chengfang, YOU Chunxue, et al. Bioactivity of essential oil of *Litsea cubeba*, from China and its main compounds against two stored product insects [J]. Journal of Asia-Pacific Entomology, 2014, 17(3): 459-466.
- [17] 鞠克升. 珠光香青挥发油对赤拟谷盗的趋避和触杀作用[J]. 甘肃农业科技, 2017(9): 29-33.

(责任编辑: 田 喆)