

张驰成, 吴伟怀, 梁艳琼, 等. 王草茎点霉叶斑病原鉴定及生物学特性[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(6): 210–214.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.06.057

王草茎点霉叶斑病原鉴定及生物学特性

张驰成^{1,2}, 吴伟怀², 梁艳琼², 郑金龙², 习金根², 郑肖兰², 唐文^{1,2}, 许沛冬³, 李锐², 贺春萍², 易克贤²

(1. 海南大学环境与植物保护学院, 海南海口 570228; 2. 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所/农业部热带农林有害生物入侵检测与控制重点开放实验室/海南省热带农业有害生物检测监控重点实验室, 海南海口 571101; 3. 海南大学农学院, 海南海口 570228)

摘要: 针对在广西横县发生的一种王草叶斑病害, 为明确其病原种类, 采用形态学和分子生物学方法进行了鉴定, 并研究其生物学特性。结合致病菌的形态特征以及 ITS 序列系统聚类分析结果, 将其鉴定为草茎点霉 (*Phoma herbarum*)。生物学特性研究表明: 该菌菌丝体适宜生长的温度为 20~32℃, 最适温度为 25~28℃; 菌丝体生长的最适 pH 值为 5~8; 菌丝体生长的最佳碳源为葡萄糖、蔗糖和甘露醇; 最佳氮源为蛋白胨, 而尿素则不适合菌丝体生长; 光/暗交替或暗/光交替均有利于菌丝体生长; 菌丝体致死温度为 50℃, 10 min。

关键词: 王草; 茎点霉; 病原鉴定; ITS; 生物学特性

中图分类号: S435.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)06-0210-05

王草 (*Pennisetum*) 别称皇草、皇竹草, 是以象草为母本、美洲狼尾草为父本杂交 (*Pennisetum purpureum* × *P. americanum*) 育种而成^[1]。我国于 1982 年由中国热带农业科学院从哥伦比亚引进, 经过多年试种选育而成, 后定名为热研 4 号王草 (*Pennisetum purpureum* × *P. americanum* cv. Reyan No. 4)^[2]。王草为多年生牧草, 具有产量高、生长快、抗倒伏、耐干旱、抗病力强等特点, 而且茎叶柔软口感好, 营养丰富, 以优质、高产而著称, 被誉为“草中之王”^[3], 是各种草食性牲畜和鱼类的优质饲料。适宜在我国热带及亚热带种植, 目前已经在海南、广东、广西、云南等地成功种植, 是华南地区最适于集约化栽培的刈割型禾本科牧草^[4]。然而, 随着种植面积的不断扩大以及种植年限的延长, 各种病害逐渐发生并逐年加重, 很大程度上限制了包括王草在内的牧草产量及质量^[5-6]。牧草病害可使牧草生长量减少, 产草量降低, 营养成分含量和可消化率下降, 有害物质含量增加, 进而导致动物日增体质量减少^[7]。王草作为南方主要热带牧草之一, 同样面临多种病害尤其是真菌病害的影响。

2015 年 5 月, 在广西横县出现了成片王草大规模发生叶

斑病的情况, 且有迅速蔓延之势。为明确其病原, 本试验通过病原菌形态学检查, 结合分子生物学手段对该致病菌进行了鉴定, 进而对其进行了生物学特性研究, 以期在当地王草叶斑病害的发生及综合防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 从广西横县热研 4 号王草上采集病样, 经室内无菌条件下分离及单孢分离纯化得到供试菌株。

1.1.2 供试培养基 马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA): 马铃薯 200 g, 葡萄糖 15~20 g, 琼脂 15~20 g, ddH₂O 定容至 1 000 mL, 自然 pH 值; 查氏琼脂培养基 (Czapek): 硝酸钠 2 g, 磷酸氢二钾 1 g, 硫酸镁 0.5 g, 氯化钾 0.5 g, 硫酸铁 0.01 g, 蔗糖 30 g, 琼脂 15~20 g, 无菌水定容至 1 000 mL。上述培养基均于 121℃ 高压灭菌 20 min 后备用。

1.1.3 试剂及仪器 真菌核糖体内转录间隔区 (rDNA-ITS) 通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGCG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTAT TGATATGC-3') 由英潍捷基 (上海) 贸易有限公司合成。Taq 酶、PCR buffer、dNTPs、DNA 片段回收试剂盒及 T1 载体等均购自北京全式金生物试剂公司, 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 病样采集及病原菌分离纯化 采用常规组织分离法进行病原菌的分离纯化^[8]。将田间采回的发病王草叶片冲洗干净、晾干, 在病健交界处剪取 (2~3) mm × (2~3) mm 的组织块。于超净工作台中, 首先用 0.1% HgCl₂ 溶液消毒约 1 min, 然后用 75% 乙醇漂洗 30 s, 经无菌水漂洗 2~3 次后用

收稿日期: 2015-02-06

资助项目: 公益性行业 (农业) 科研专项 (编号: 201303057)。

作者简介: 张驰成 (1992—), 男, 安徽马鞍山人, 硕士研究生, 主要从事热带牧草病害调查及病原鉴定等研究。E-mail: cczhang1992@126.com。

通信作者: 贺春萍, 硕士, 副研究员, 从事橡胶树根病的拮抗菌筛选等研究, E-mail: hechunpp@163.com; 易克贤, 博士, 研究员, 从事热带牧草、剑麻和芦笋真菌病害与抗性遗传育种研究, E-mail: yikexian@126.com。

1475-1488.

[24] 李金花, 潘浩文, 王刚. 草地植物种群繁殖对策研究[J]. 西北植物学报, 2004, 24(2): 352-355.

[25] 邢福, 郭继勋, 王珂. 狼毒种群生殖构件数量特征与生殖配置研究[J]. 草业学报, 2005, 14(4): 111-115.

[26] 靳牡丹, 邹春静, 宋晴. 草本植物生殖分株的数量特征和生殖分配的时空动态研究进展[J]. 山西师范大学学报: 自然科学版, 2007, 21(1): 80-85.

[27] 郭正刚, 田福平, 王锁民, 等. 硅对紫花苜蓿生物学特性的影响[J]. 生态学报, 2006, 26(10): 3302-3307.

灭菌滤纸吸干,置于 PDA 培养基中,在 25 ℃ 条件下培养 2 ~ 3 d。待菌落长出后,从其边缘挑取菌丝块,置于平板 PDA 培养基上进行纯化,获得分离菌株。

1.2.2 病原菌形态学鉴定 将分离纯化得到的病原菌接种于 PDA 培养基平板上,25 ℃ 培养 6 ~ 7 d,期间观察并记录菌落在培养基上的生长状况;在显微镜下观察菌丝体与分生孢子的形态,测量分生孢子的大小,并拍照保存。

1.2.3 病原菌致病性测定 取健康王草嫩叶,先用无菌水洗净,再经 75% 乙醇消毒,并再次用无菌水冲洗后晾干。将直径 5 mm 的菌饼接种于经消毒针头刺伤的叶片(菌丝面紧贴在叶片伤口处),每叶接种 2 块菌饼,重复处理 3 个叶片,接种无菌培养基块作为对照。于托盘内保湿。接种 2 d 后开始观察发病症状,3 d 后除去菌丝块,记录病斑大小和颜色。待接种叶片发病后,按照柯赫氏法则,从病部再分离病原菌,观察所得分离物与原接种病原菌的形态特征是否一致。

1.2.4 病原菌分子生物学鉴定

1.2.4.1 病原菌基因组 DNA 的提取和 PCR 扩增 用真菌 DNA 提取试剂盒(Biomiga Fungal gDNA Kit)提取供试菌株 DNA,于超微量紫外分光光度计测定 DNA 浓度及纯度,其余的 DNA 溶液置于 -20 ℃ 冰箱保存备用。用引物 ITS1/ITS4 对其 rDNA 的 2 个内转录间区和 5.8S 区段进行 PCR 扩增。每个反应体系体积为 20 μL:10 × PCR 反应缓冲液 2 μL, dNTPs (10 mmol/L) 1.6 μL,引物 ITS1 和 ITS4 (10 μmol/L) 各 0.5 μL, *Taq* DNA 聚合酶(5 U/μL) 0.2 μL, DNA 模板 1 μL, ddH₂O 补足 20 μL。用双蒸灭菌水代替模板 DNA 作阴性对照。PCR 扩增反应在 PCR 扩增仪(Eppendorf Mastercycler gradient)上进行。扩增程序为:94 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 变性 30 s,60 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 45 s,35 个循环;最后 72 ℃ 延伸 5 min,4 ℃ 保存。取 5 μL PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,分析 PCR 产物片段大小,并用凝胶成像系统拍照保存。

1.2.4.2 PCR 产物的回收、克隆及测序 PCR 产物经电泳分离后,在紫外灯下切下含目的片段的琼脂糖凝胶,转入无菌的微量离心管,用胶回收试剂盒(OMEGA Gel Extraction Kit)回收纯化,具体操作步骤参见说明书;与 T1 载体连接后转化感受态 DH5α。经蓝白斑筛选后,随机挑取 5 个白斑,利用通用引物 M13F/R 对待鉴定的菌液进行 PCR 鉴定。反应体系以及 PCR 扩增反应程序参照“1.2.4.1”节。反应结束后,取 5 μL 扩增产物 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后紫外灯下检查扩增结果。选取阳性克隆,提取质粒 DNA,送英潍捷基(上海)贸易有限公司测序。

1.2.4.3 病原菌 rDNA - ITS 序列系统发育树的构建 获得的序列在 DNASTar 中,利用 ITS1、ITS4 引物序列去除多余的载体序列。将所得序列在 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行 Blast 比对及同源序列分析,并下载 *Phoma* 属的 *P. herbarum*、*P. omnivirens*、*P. eupyrena*、*P. schachtii*、*P. muscivora*、*P. haematocycla*、*P. polemonii*、*P. dutchum*、*P. multi-rostrata*、*P. aliena*、*P. costarricensis*、*P. sexea*、*P. destructiva*、*P. bulgarica*、*P. pereupyrena*、*P. matteucciicola*、*P. insulana*、*P. digitalis*、*P. crystallifera*、*P. acetosellae* 等 20 个种的 37 条 rDNA - ITS 序列。利用 MEGA 4.0 软件中邻接法(neighbor-joining,

NJ) 进行聚类分析,绘制出相应的系统发育树,重复次数为 1 000 次。

1.2.5 病原菌生物学特性研究

1.2.5.1 病原菌菌丝体生长特性测定 将供试病原菌在 PDA 培养基平板上于 28 ℃ 培养 5 d,用无菌的打孔器在菌落边缘打取直径 5 mm 的菌饼备用。将菌饼接种于 PDA 平板中央,分别置于 5、10、15、20、25、28、32、37 ℃ 以及 40 ℃ 恒温培养箱中培养;另将接种供试菌株的 PDA 平板分别置于完全光照、完全黑暗、光/暗交替(18 W,1 根灯管;光照和黑暗各 12 h)、暗/光交替(黑暗和光照各 12 h)的 28 ℃ 恒温条件下培养;用稀盐酸和氢氧化钠溶液将 PDA 培养基的 pH 值分别调节为 4、5、6、7、8、9、10、11 后制成 PDA 平板,将菌饼接种于不同 pH 值的平板中央,28 ℃ 恒温培养;用等量的碳源(麦芽糖、D - 果糖、葡萄糖、乳糖和甘露醇)及氮源(蛋白胨、甘氨酸、牛肉浸膏、尿素和 L - 天冬酰胺)分别替换 Czapek 培养基中的蔗糖和硝酸钠,制成含不同碳氮源的 Czapek 培养基平板,分别以不含碳源(蔗糖)及氮源(硝酸钠)的培养基为对照,将供试菌株菌饼接种于平板中央,28 ℃ 恒温培养;所有处理均重复 5 次,培养 5 d 后用十字交叉法测量菌落直径并计算菌丝体生长速率,用 SAS 软件对试验结果进行统计分析。

1.2.5.2 病原菌致死温度和时间测定 在含有 2 mL 无菌水的试管中加入供试菌株菌饼,分别在 45、50、55、60、65 ℃ 的恒温水浴锅中加热 10 min,20 min 后迅速冷却,取菌饼接种在 PDA 培养基平板中央,28 ℃ 恒温培养,逐日观察菌丝体生长情况。

2 结果与分析

2.1 王草叶斑病田间发病症状

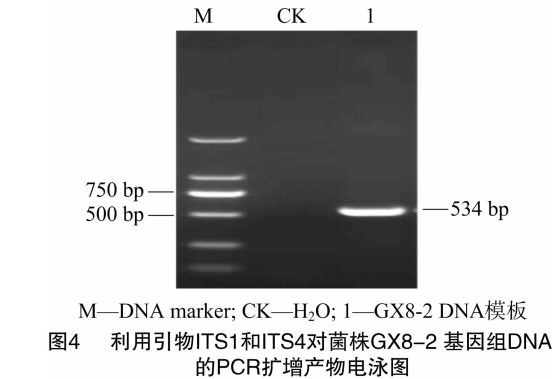
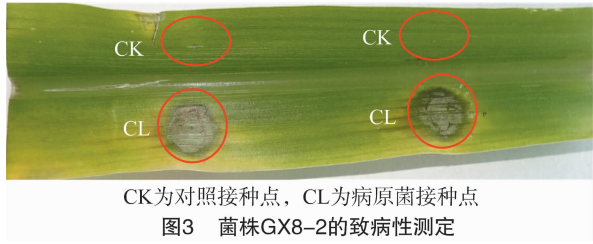
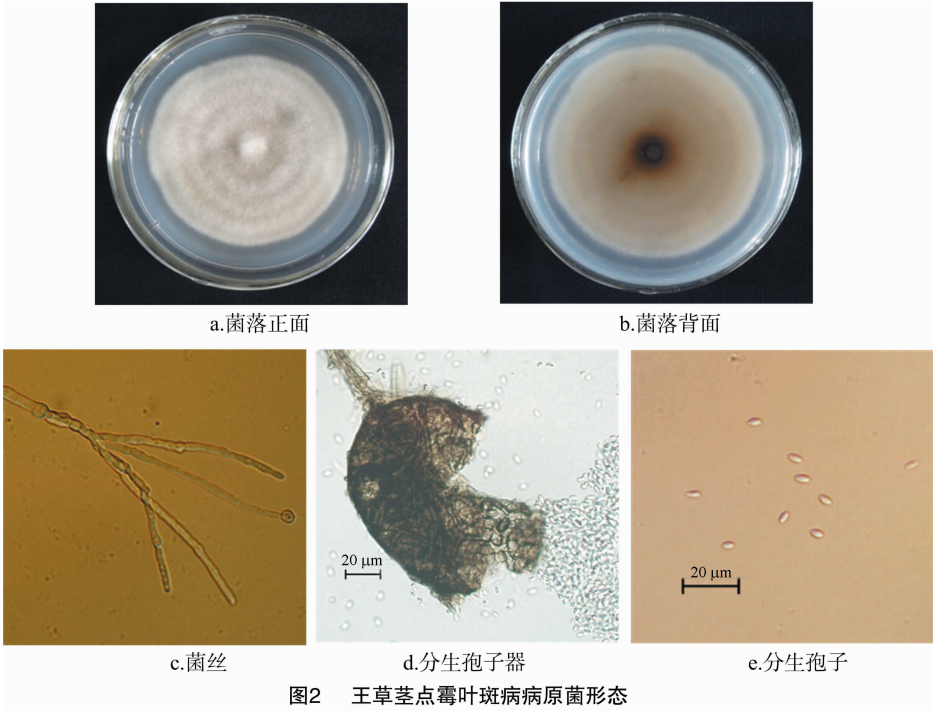
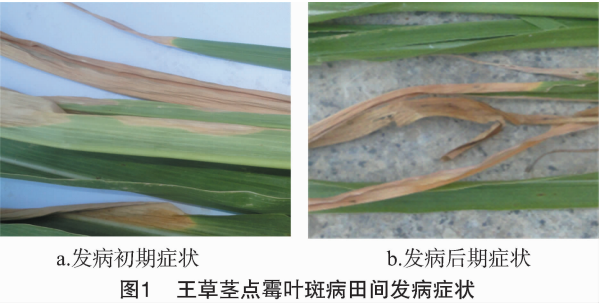
田间调查发现,该病主要危害王草叶片,在叶片边缘或尖端形成枯黄色条状斑点(图 1 - a,后期整个叶片黄化枯死并且变脆,有黑色小霉点形成(图 1 - b)。经室内分离后及单孢纯化得到 3 个菌株,编号分别为 GX8 - 2、GX12、GX 叶斑 - 2。经镜检表明,这 3 个菌株的培养性状、菌丝体及分生孢子形态等均相同,因此认为属于同一种真菌,故后续研究只对 GX8 - 2 进行研究。

2.2 病原菌的培养形状和形态学观察

菌株在 PDA 培养基上的菌落形态呈近圆形,有轮纹,边缘不均匀,菌落中央稍隆起,菌丝灰白色,生长旺盛,棉絮状(图 2 - a、图 2 - b)。经显微镜观察发现,菌丝表面粗糙、不平滑(图 2 - c),分生孢子器呈椭圆形,黑褐色,具孔口,表面不光滑,大小约为 124.78 μm × 92.99 μm(图 2 - d);分生孢子呈卵圆形或椭圆形,无色单胞,大小为(5.16 ~ 6.92) μm × (2.56 ~ 3.54) μm(图 2 - e)。其形态特征与茎点霉(*Phoma* sp.)描述高度相符。

2.3 致病性测定

将纯化后的单孢菌株 GX8 - 2 菌块接种至王草叶片上,2 ~ 3 d 后,接种叶片均表现病症,接种发病症状与大田发病初期症状一致,但比大田自然发病初期症状严重(图 3)。根据柯赫氏法则将发病组织进行再分离,获得的分离物形态特征与原接种菌株一致,表明所获得的分离物为王草叶斑病的致病菌。



序列同源性达 99%。通过与 GenBank 数据库中登录的 20 个 *Phoma* 属序列构建的系统发育树揭示, GX8-2 与 *Phoma herbarum* 的同源性最高, 聚为一个分枝(图 5)。最终结合形态

2.4 病原菌 ITS 序列分析

利用引物 ITS1/ITS4 对菌株 GX8-2 的 DNA 模板进行 PCR 扩增, 经琼脂糖凝胶电泳检测表明, 该引物从基因组中扩增出 1 条特异性条带, 其大小介于 500 ~ 750 bp 之间(图 4)。经克隆测序最终获得 534 bp rDNA-ITS 序列, 将该序列提交至 GenBank 数据库, 获得序列登录号为 KU324835。经 Blast 比对分析发现, 该序列与数据库中已登录的 *Phoma herbarum*(KJ767078. 1, AB369456. 1, KJ767079. 1) 草茎点霉 ITS

学观察结果, 将 GX8-2 鉴定为草茎点霉(*Phoma herbarum*)。

2.5 病原菌生物学特性

2.5.1 病原菌菌丝体生长特性 病原菌菌丝体生长特性测定结果表明, 适宜草茎点霉菌株 GX8-2 生长的温度范围为 25 ~ 32 ℃, 最适生长温度为 25 ℃, 当温度低于 10 ℃ 或高于 37 ℃ 时, 菌丝体生长受到抑制或无法正常生长(图 6); 光/暗交替或暗/光交替条件最适宜菌丝体生长, 完全黑暗或完全光照条件下菌丝体生长速率相对较慢(图 7); 在供试的所有 pH 值下 GX8-2 菌丝体均能生长, 最适宜菌丝体生长的 pH 值范围为 5 ~ 8(图 8); 该菌在含有葡萄糖、蔗糖和甘露醇的查氏培养基上生长状况良好且生长状况较一致, 在含有乳糖的查氏培养基上生长受到一定的影响, 菌丝体稀薄, 在不含任何碳源的查氏培养基上生长时, 菌丝体极其稀薄, 肉眼几乎很难看到(图 9); 该菌在含有不同氮源的查氏培养基上生长状况存在较大差异, 在含有蛋白胨的培养基上生长最快, 且菌丝密实, 在含有尿素的培养基上生长最慢, 在不含任何氮源的培养基上生长时菌丝稀薄, 生长不旺盛(图 10)。

2.5.2 病原菌致死温度和时间 菌株 GX8-2 经 45 ℃ 处理 10 ~ 30 min 后仍然能在 PDA 平板上正常生长, 但是在 50 ℃ 及以上温度处理 10 min 后不能生长。由此表明, 菌株 GX8-2 菌丝体的致死温度为 50 ℃ 10 min。

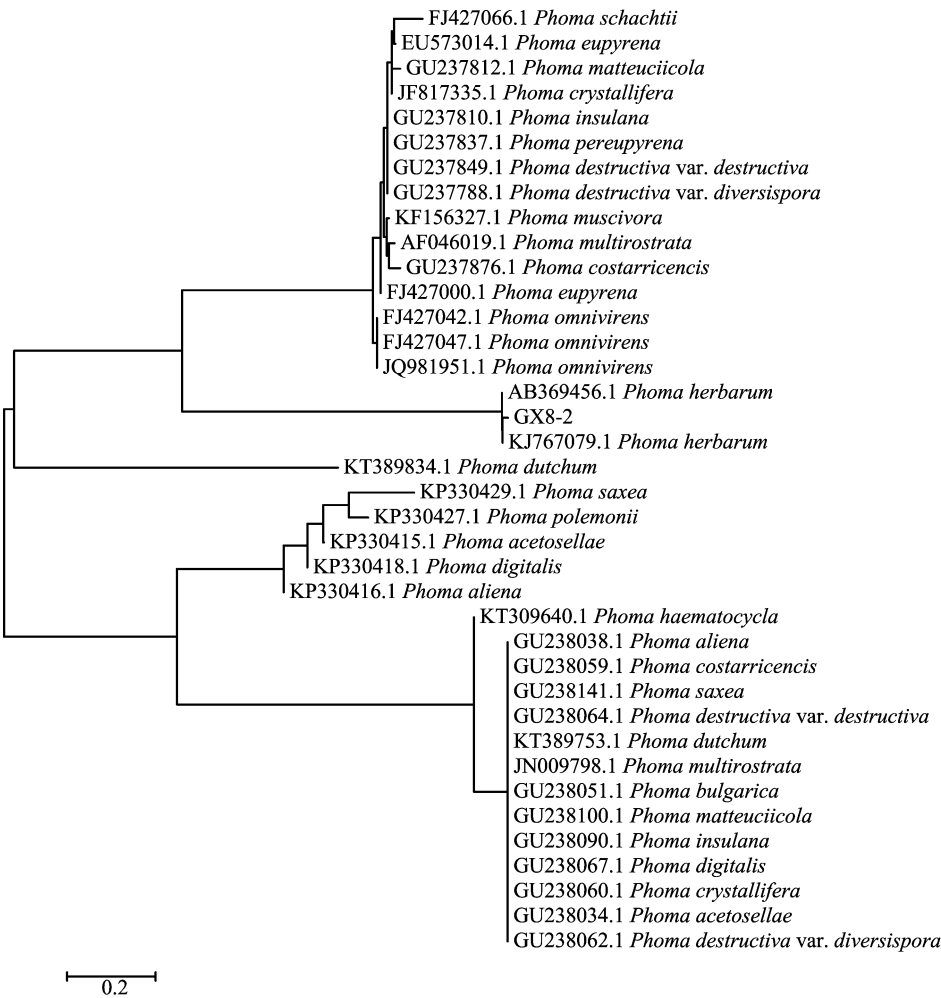


图5 基于rDNA-ITS序列构建的*Phoma*属系统发育树

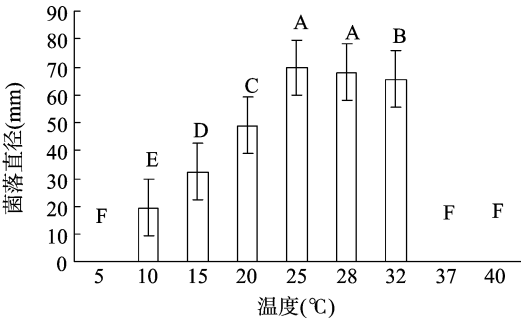


图6 温度对菌丝生长的影响

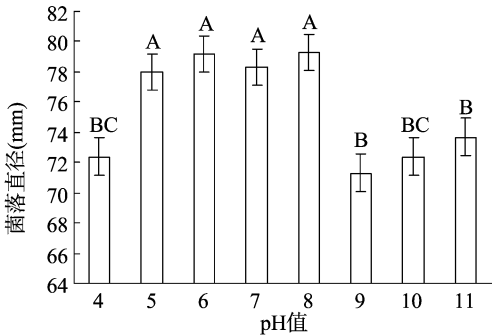


图8 pH值对菌丝体生长的影响

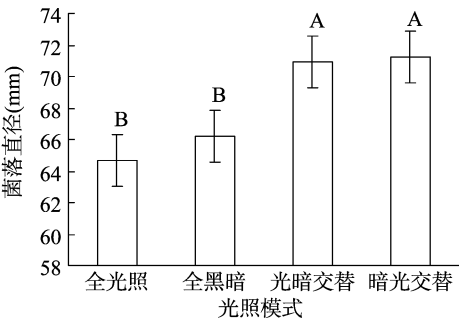


图7 光照条件对菌丝体生长的影响

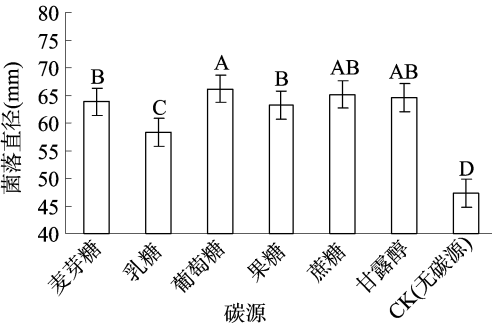


图9 碳源对菌丝体生长的影响

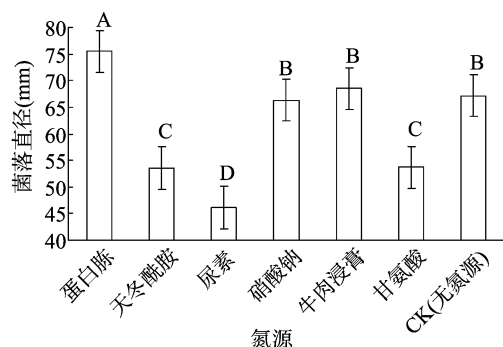


图10 氮源对菌丝体生长的影响

3 讨论

热带、亚热带地区多年生牧草资源十分丰富,而高温高湿的气候也非常适宜病原微生物的生长和繁殖,导致热带牧草病害普遍发生,严重影响牧草产量及干草质量。练启仙等2004—2005年对贵州花江地区王草病害调查结果表明,该地区有茎腐病(病原为 *Gibberella* sp.)、褐斑病(病原为 *Alternaria* sp.)、叶斑病(病原为 *Phoma* sp.)、斑点病(病原为 *Epicoccum* sp.)和纹枯病(病原为 *Rhizoctonia* sp.)等典型病害^[9-10]。郑丽等对海南省牧草病害调查结果表明,造成海南王草叶斑病害的病原菌主要有 *Phoma* sp.、*Rhizoctonia oryzae*、*Curvular* sp.、*Drechslera sacchari* 和 *Alternaria* sp. 5种^[11]。虽然国内对由 *Phoma* sp. 侵染王草引起的叶斑病早有记录,但未见对该病病原进行系统生物学的报道。

笔者从发生在广西横县地区王草叶斑病病叶上,分离得到1株致病菌GX8-2。经形态学观察和分子生物学鉴定将其鉴定为草茎点霉(*Phoma herbarum*),并对其生物学特性进行了初步研究。研究表明,适宜GX8-2菌株生长的温度范围为25~32℃,这与张翠英的研究结果^[12]相符合,只有温度低于10℃或高于37℃时,菌丝体的生长才会受到抑制或无法正常生长;该病菌的适宜pH值范围很广,酸或碱的条件对其菌丝生长影响不大;GX8-2菌株在含有葡萄糖、蔗糖和甘露醇的查氏培养基上生长状况良好且生长状况较一致,会产生红色素,与许爱清等报道的由镉诱导草茎点霉产生红色素的描述^[13]类似;该病菌对碳氮源的要求不严格,仅是以尿素为氮源时病原菌的生长状况不太理想,说明该菌有很强的环境适应性。本次在广西横县暴发的王草茎点霉叶斑病发生情况十分严重,这可能与该病原菌对环境的适应性较强有一定的关系。

茎点霉属真菌种类繁多,且大部分是重要的植物致病菌,能侵染植物并引起叶斑、茎枯、根腐和果腐等症状^[14-17]。在牧草上,多喙茎点霉(*Phoma multirostrata*)侵染多花筋骨草引起黑胫病,导致植株整株枯萎死亡^[18]。苜蓿茎点霉(*Phoma medicaginis*)引起苜蓿黑胫病和叶斑病^[19-21],以及茎点霉(*Phoma* sp.)引起红豆草叶斑病^[6]均有报道。不同病原菌侵染植物发生叶斑病的危害症状较为相似^[22-24],给病害诊断及病原鉴定带来了较大困难。是否可以根据不同的牧草叶斑病害开发出田间快速检测及诊断的方法,值得进一步研究。

参考文献:

[1] 刘国道. 热带牧草栽培学[M]. 北京:中国农业出版社,2006:

82-87.

- [2] 刘国道,白昌军,王东劲,等. 热研4号王草选育[J]. 草地学报, 2002,10(2):92-96.
- [3] 孙凡. 草中之王——皇竹草[J]. 山区开发,2003(8):12-13.
- [4] 涂旭川,刘国道,白昌军,等. 热研4号王草栽培技术初探[J]. 中国农学通报,2008,24(10):533-535.
- [5] 南志标. 锈病对豆科牧草生长和营养成分的影响[J]. 草业学报,1990,1(1):83-87.
- [6] 聂红霞,李彦忠. 茎点霉叶斑病对红豆草产量和养分的影响[J]. 草业科学,2014,31(4):689-696.
- [7] Leath K T, Shenk J S, Barner R F. Relation of foilar disease to quality of alfalfa forage[J]. Agronomy,1974,66:675-677.
- [8] 方中达. 植病研究方法[M]. 3版. 北京:中国农业出版社,1998:142-145.
- [9] 练启仙,桑维钧,李小霞,等. 贵州花江地区皇竹草真菌病害种类调查及防治[C]//2007年中国科学技术协会年会议文集,武汉, 2007:225-227.
- [10] 练启仙,桑维钧,杨茂发,等. 贵州皇竹草纹枯病的发生特点与防治建议[J]. 山地农业生物学报,2006,25(2):177-178.
- [11] 郑丽,易小平,文衍堂,等. 海南省热带牧草病害调查及病原菌初步鉴定[J]. 热带作物学报,2014,35(5):967-973.
- [12] 张翠英. 云南玄参主要真菌病害病原菌鉴定及生物学特性研究[D]. 昆明:云南农业大学,2009:53.
- [13] 许爱清,宋早文,蓝淑莉,等. 镉诱导抗镉茎点霉产生水溶性红色素[J]. 环境科学与技术,2014,37(7):61-65.
- [14] 谢昌平,张能,纪焯斌,等. 香蕉茎点霉鞘腐病的病原鉴定与药剂毒力测定[J]. 热带作物学报,2007,28(3):88-92.
- [15] Ni M, Liu T, Ding Y, et al. A leaf spot of figwort (*Scrophularia ningpoensis*) caused by *Phoma* sp. [J]. Canadian Journal of Plant Pathology,2010,32(4):493-495.
- [16] 常瑾,井金学,张海宽,等. 陕西黄答茎枯病病原菌的鉴定[J]. 西北林学院学报,2006,21(3):81-82.
- [17] 陈卫民,郭庆元,宋红梅,等. 国内新病害——向日葵茎点霉黑茎病在新疆伊犁河谷的发生初报[J]. 云南农业大学学报, 2008,23(5):609-612.
- [18] 吴玲,胡小倩,楼兵干,等. 多花筋骨草黑胫病及其病原菌鉴定[J]. 菌物学报,2009,28(6):765-768.
- [19] Akamatsu H O, Chilvers M I, Peever T L. First report of spring black stem and leaf spot of alfalfa in Washington State caused by *Phoma medicaginis*[J]. Plant Disease,2008,92(5):833.
- [20] 张丽,潘龙其,王生荣,等. 苜蓿茎点霉叶斑病病原鉴定及生物学特性研究[J]. 中国农业大学学报,2015,20(4):158-166.
- [21] 王瑜,刘怡,周彬彬,等. 苜蓿对匍柄霉叶斑病与茎点霉叶斑病的抗性评价研究[J]. 草业学报,2015,24(7):155-162.
- [22] 谢美华,李霖,李雪玲,等. 苜蓿叶斑病病原菌分离鉴定和生物学特性[J]. 江苏农业科学,2015,43(2):130-133.
- [23] 谢美华,李霖,李雪玲,等. 云南红豆杉叶斑病病原菌的分离鉴定和生物学特性[J]. 江苏农业科学,2014,42(11):146-149.
- [24] 赵丽萍,赵统敏,余文贵,等. 番茄灰叶斑病研究进展[J]. 江苏农业学报,2014,30(6):1524-1530.