

刘小玉,付登强,余凤玉,等. 海南花生果腐病菌的分离、鉴定及生物学特性研究[J]. 江苏农业科学,2020,48(6):104-107.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.06.021

海南花生果腐病菌的分离、鉴定及生物学特性研究

刘小玉,付登强,余凤玉,杨伟波,尹欣幸

(中国热带农业科学院椰子研究所/国家花生工程技术研究中心海南花生科研工作站,海南文昌 571339)

摘要:近几年,花生果腐病是花生上发生较为严重的一种病害,为明确海南花生果腐病病原菌的生物学特性,有效开展病害防治工作,降低该病危害,采用病原菌分离、鉴定,并对其生物学特性进行研究。通过对其培养特性、形态特征的观察及 rDNA 的转录间隔区(internal transcribed spacers,简称 ITS)序列测定,与 GenBank 中同源性较高的菌株进行序列对比,最后将菌株 JGF2 确定为镰刀菌。生物学特性研究表明,JGF2 菌丝在 PDA 培养基上生长最快,菌丝生长的最适宜温度为 20~35℃,最适 pH 值为 8,乳糖为最佳碳源,牛肉浸膏为最佳氮源。

关键词:海南省;花生;果腐病;鉴定;生物学特性;转录间隔区

中图分类号:S435.652 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)06-0104-03

花生是我国重要的油料作物和经济作物之一,具有很高的营养价值和经济价值,在国民经济中占有重要地位,而近年来我国各大花生产区不断受到植物病害的侵染,严重影响花生产量和品质^[1-3]。花生果腐病,别称烂果病,主要表现在花生荚果腐烂,轻者半个荚果为褐色或黑色,里面的籽粒小而硬实,发育不良,严重者整个荚果都为深黑色,果皮和籽粒均已腐烂。花生果腐病在我国各大花生产区发生,轻则减产 20%,严重的减产 80% 以上,尤其是在重茬地块,有逐年加重趋势^[4-5]。国内外研究报道,花生果腐病的病原菌种类复杂,不同地域有不同的致病病原菌,目前我国山东^[6]、河北^[7]等地有花生果腐病病菌分离鉴定的相关报道,但海南花生还未见相关报道。鉴于果腐病对花生产业的潜在威胁,本研究通过组织分离法对海南文昌花生果腐病的病原菌进行分离、鉴定,并对形态学及生物学特性进行研究,旨在明确病原菌种类,探明其发生传播规律,为该病害的防治提供理论依据。

1 材料与方法

收稿日期:2019-01-22

基金项目:海南省重点研发项目(编号:ZDYF2018100);中国热带农业科学院基本科研业务费专项资金(编号:1630022016006-05);海南省自然科学基金青年基金(编号:318QN276)。

作者简介:刘小玉(1986—),女,江西九江人,硕士研究生,助理研究员,主要从事热带作物丰产栽培研究。E-mail:liuxiaoyu06120210@163.com。

1.1 材料与培养基

1.1.1 试验材料 从海南文昌花生地采集 5 株地下荚果有黑色不规则病斑、地上部叶片脱落的花生样品。

1.1.2 培养基 培养基配制方法参考余凤玉等报道^[8]。

1.2 方法

1.2.1 病原菌的分离 采用常规组织分离法分离病原菌^[9]。

1.2.2 致病性测定 按照柯赫氏法则进行致病性测定。

1.2.3 病原菌形态学观察 将纯化后的病原菌接种到 PDA 培养基平板上,在 25℃ 恒温培养箱中黑暗培养,观察记录菌落形态学特征。

1.2.4 DNA 提取、PCR 扩增及序列测定 将分离菌株在 PDA 培养基上培养 5~7 d 后,收集新鲜的湿菌体 0.1~0.3 g,用液氮在研钵中磨碎,装入 1.5 mL 的离心管中,然后用基因组 DNA 快速提取试剂盒(真菌)提取 DNA。利用通用引物 ITS1 和 ITS4 对病原菌的 rDNA-ITS 区进行 PCR 扩增。并将 PCR 产物送至北京六合华大基因科技股份有限公司进行测序。将该序列通过 Blast 程序与 GenBank 中核酸数据进行比对分析,采用 BioEdit、Mega 5.0 等软件对菌株进行系统发育分析,构建系统发育树。

1.2.5 培养基对菌丝生长的影响 将活化的供试菌株用打孔器打成直径为 6 mm 的菌饼,接种于直径为 9 cm 的 6 种供试培养基平板中央,25℃ 恒温

培养,每个处理重复 5 次,2 d 后用十字交叉法测量菌落直径。

1.2.6 pH 值对菌丝生长的影响 用 0.1 mol/L HCl 溶液和 0.1 mol/L NaOH 溶液将 PDA 培养基 pH 值调节到 4、5、6、7、8、9、10、11 共 8 个酸碱度。其他同“1.2.5”节。

1.2.7 碳源对菌丝生长的影响 以 Czapek 培养基为基础培养基,其中蔗糖分别用等质量碳素的甘露醇、D-果糖、葡萄糖、可溶性淀粉、乳糖、阿拉伯树胶粉、甘油等 7 种碳源替代,设置无碳作为对照,配制不同的碳源培养基。其他同“1.2.5”节。

1.2.8 氮源对菌丝生长的影响 以 Czapek 培养基为基础培养基,其中硝酸钠分别用等质量氮素的蛋白胨、硫酸铵、硝酸钾、牛肉膏、磷酸二氢铵等 5 种氮源替代。设置无氮作为对照,配置成不同的氮源培养基。其他同“1.2.5”节。

2 结果与分析

2.1 病原菌分离纯化及致病性

从发病花生果壳样品中,分离到 5 个分离物,用孢子悬浮液接种到花生荚果上,5 株均产生与田间相似症状,其中 JGF2 致病性最强。从接种发病的花生病健交界处分离纯化病菌,经比较与原接种菌株在形态上相同,确认所分离到的分离物为发病植株的病原菌。

菌株 JGF2 25 °C 在 PDA 培养基上菌丝为白色,绒毛状,显微镜观察到 2 种不同分生孢子,大型分生孢子镰刀型,稍弯曲,3~5 个隔膜;小型分生孢子长

椭圆形至卵圆形,无隔或 1 个分隔。依据 Leslie 等的方法^[10]鉴定该病原菌均为镰刀菌。

2.2 病原菌基因序列分析

经 rDNA ITS1 和 ITS4 引物对菌株 JGF2 进行 PCR 扩增,获得 1 条长度为 595 bp 的片段。将该序列与 GenBank 中核酸数据库(<http://ncbi.nlm.nih.gov/blast>)进行同源性比较,基于 ITS 序列构建系统发育树。如图 1 所示,菌株 JGF2 与镰刀菌同源性高达 100%,进化分析聚在同一分支上,因此可以确定菌株 JGF2 为镰刀菌。

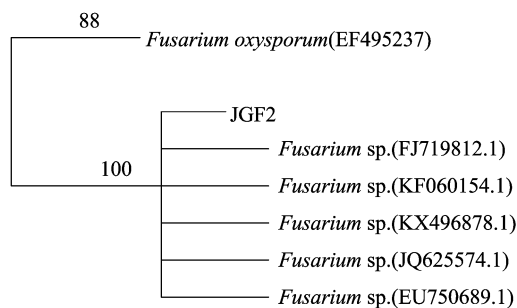


图1 系统发育树

2.3 培养基对菌丝生长的影响

菌株 JGF2 在 6 种不同的培养基上均能生长,但在 PDA 培养基上菌丝生长最快,菌落直径最大,2 d 后均长满平板,且菌落致密浓厚;其次为 Richard 培养基,菌落直径为(8.0 ± 0.8) cm;在琼脂培养基上生长较差,菌落直径最小,仅有(4.5 ± 0.3) cm,菌丝也最稀疏。由图 2 可知,菌株 JGF2 在不同培养基上菌丝生长差异明显,PDA 培养基最有利于菌丝的生长。

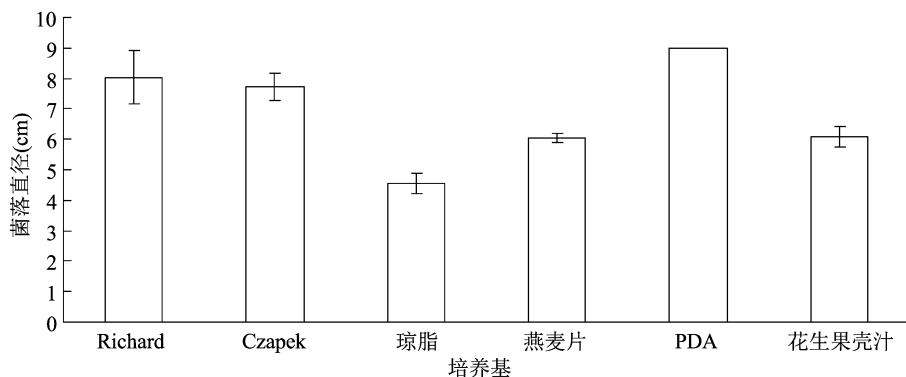


图2 不同培养基对菌丝生长的影响

2.4 pH 值对菌丝生长的影响

由表 1 可知,菌株 JGF2 在 pH 值为 4~11 条件下菌丝均能生长,其中 pH 值为 8 时,菌丝生长最快,长满平板,而且菌丝生长茂盛、紧密;而在 pH 值

为 9~11 条件下,菌丝生长差异不显著。

2.5 碳源对菌丝生长的影响

不同碳源对菌株 JGF2 菌落生长的影响不明显,最适宜的碳源是乳糖,菌落直径为 7.7 cm,其次

表 1 不同 pH 对菌丝生长的影响

不同 pH 值	菌落直径 (cm)	长势
4	4.20 ± 1.40Ee	差,菌丝稀薄
5	7.10 ± 2.10Dd	好,菌丝茂密
6	7.10 ± 0.90Dd	好,菌丝茂密
7	7.56 ± 1.80Cc	好,菌丝茂密
8	9.00 ± 0.00Aa	好,菌丝茂密
9	8.13 ± 2.30Bb	好,菌丝茂密
10	8.00 ± 2.00Bb	好,菌丝茂密
11	8.10 ± 1.50Bb	好,菌丝茂密

注:同列不同大写字母、小写字母分别表示在 0.01、0.05 水平差异显著。表 2、表 3 同。

是蔗糖和葡萄糖,菌落直径均为 7.5 cm,但各处理间差异不显著。对照组的菌落直径为 6.5 cm。在碳素培养基上菌丝生长浓密,而对照组的菌丝较稀薄(表 2)。

表 2 不同碳源对菌丝生长的影响

不同碳源	菌落直径 (cm)	长势
蔗糖	7.5 ± 0.8Aa	好,菌丝茂密
甘露醇	7.4 ± 1.1Aa	好,菌丝茂密
D-果糖	7.3 ± 1.2Aa	好,菌丝茂密
葡萄糖	7.5 ± 0.9Aa	好,菌丝茂密
可溶性淀粉	7.4 ± 1.0Aa	好,菌丝茂密
乳糖	7.7 ± 0.9Aa	好,菌丝茂密
阿拉伯树胶粉	7.3 ± 1.1Aa	好,菌丝茂密
甘油	7.3 ± 0.6Aa	好,菌丝茂密
无碳 CK	6.5 ± 1.2Bb	差,菌丝稀薄

2.6 氮源对菌丝生长的影响

由表 3 可知,不同氮源对菌株 JGF2 菌丝生长的影响显著,最适宜的氮源是牛肉浸膏,长满平板;其次是硝酸钠,菌落直径为 8.1 cm;硫酸铵作为氮源菌落直径最小,为 2.7 cm,不适合该病原菌的生长;对照的菌落直径为 7.1 cm,但菌丝相当稀薄,在生长范围内,培养基并未完全被菌丝覆盖,而其他氮素培养基上,在生长范围内培养基被菌丝完全覆盖,菌丝浓密。

3 讨论与结论

随着人民生活水平的提高,嫩花生作为鲜食食品越来越受大家的青睐,发展前景十分广阔。然而,近年来我国各大花生产区不断受到植物病害的影响,特别是花生果腐病发病频繁。花生果腐病别

表 3 不同氮源对菌丝生长的影响

不同氮源	菌落直径 (cm)	长势
硝酸钠	8.1 ± 0.8Bb	好,菌丝茂密
硝酸钾	4.4 ± 0.9Ff	好,菌丝茂密
硫酸铵	2.7 ± 1.1Gg	好,菌丝茂密
牛肉浸膏	9.0 ± 0.0Aa	好,菌丝茂密
蛋白胨	7.8 ± 1.7Cc	好,菌丝茂密
磷酸二氢铵	6.1 ± 1.4Ee	好,菌丝茂密
无氮 CK	7.1 ± 1.1Dd	差,菌丝稀薄

称烂果病,在多年重茬种植的地块结荚期遇雨水较多时发病加重。由于常年高温多湿的气候影响,海南花生果腐病已成为花生的一种主要病害,对产量和品质的影响极其严重。本研究通过对花生果腐病病菌的鉴定,尤其是对其进行系统的生物学特性研究,为该病害田间防治奠定理论基础。

根据病原菌的形态学特征分析结果,花生果腐病病原菌鉴定为镰刀菌。镰刀菌尤其是茄病镰刀菌在自然界中普遍存在,是多种植物及动物的致病菌^[11-12],能引起植物根腐、枯萎等症状,其产生的毒素不仅影响植物生长,也影响植物品质^[13]。本研究表明,从海南省文昌市采集到的花生果腐病主要是由镰刀菌引起的,其镰刀菌 ITS 序列长度为 595 bp,是否还有其他病菌与之混合侵染,需进一步采样分离鉴定。另外,本试验生物学特性研究表明,菌株 JGF2 菌丝在 PDA 培养基上生长最快,菌丝生长的最适宜温度为 20~35℃,最适 pH 值为 8,乳糖为最佳碳源,牛肉浸膏为最佳氮源。

参考文献:

[1] 傅俊范,王大洲,周如军,等. 辽宁花生网斑病发生危害及流行动态研究[J]. 中国油料作物学报,2013,35(1):80-83.

[2] 张宗义,许泽永,陈坤荣,等. 黄瓜花叶病毒 CA 株系在花生上流行的研究[J]. 植物病理学报,1993,23(4):69-74.

[3] 何晶晶,周如军,崔健潮,等. 不同杀菌剂对花生网斑病菌室内毒力测定及田间防效研究[J]. 中国油料作物学报,2015,37(4):525-531.

[4] 李术臣,贾海民,赵聚莹,等. 河北省花生果腐病病原鉴定及致病性研究[J]. 河北农业科学,2011,15(5):37-39.

[5] 李术臣,陈丹,贾海民,等. 花生果腐病研究进展[J]. 河北农业科学,2010,14(9):74-75.

[6] 张成玲,张田田,吴翠霞,等. 花生果腐病病原鉴定及生物学特性[J]. 花生学报,2016,45(3):27-31.

[7] 王传堂,禹山林,于洪涛,等. 花生果腐病病原分子诊断[J]. 花生学报,2010,39(1):1-4.

[8] 余凤玉,林春花,朱辉,等. 椰子茎沟病菌生物学特性研究[J]. 热带作物学报,2011,32(6):1122-1127.

张俊喜,成晓松,葛兆建,等. 稻曲病田间简易接种方法——厚垣孢子直接喷雾法[J]. 江苏农业科学,2020,48(6):107-109.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.06.022

稻曲病田间简易接种方法——厚垣孢子直接喷雾法

张俊喜¹,成晓松²,葛兆建¹,高波¹,霍金兰³,王凯¹,李红阳¹,顾慧玲¹,

陈中兵¹,孙星星¹,马晶晶¹,蒋颖洁¹,王凡¹

(1. 江苏沿海地区农业科学研究所,江苏盐城 224002; 2. 江苏省盐城市盐都区病虫害测报站,江苏盐城 224005;

3. 江苏省盐城市盐都区气象局,江苏盐城 224005)

摘要:介绍一种简易稻曲病田间接种方法(厚垣孢子直接喷雾),包括菌源的采集保存、水稻种植过程、接种体制备、接种实施过程以及最终接种效果,为水稻新品种对稻曲病的抗性田间鉴定、杀菌剂新品种对稻曲病的田间药效试验提供一种简易可行的操作方法,从而为水稻生产上新品种、新药剂的选择提供保障。

关键词:稻曲病;田间接种;厚垣孢子;杀菌剂;鉴定

中图分类号:S435.111.4⁺6 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)06-0107-03

水稻稻曲病是由稻绿核菌[有性态:*Villosiclava virens* (Nakata) E. Tanaka & C. Tanaka; 无性态:*Ustilaginoida virens* (Cooke) Takah.]引起的水稻穗部谷粒病害,是一种全球性的真菌病害,在亚洲、美洲、非洲等许多国家和地区均有较大面积发生,发病严重时,病穗率可达 40% 以上。近年来,由于水稻耕作制度和生产技术条件发生较大变化,我国稻曲病发生日趋加重,已从次要病害上升为主要病害。穗粒发病后内部菌丝体膨大,呈现大于穗粒多倍的稻曲球,不但影响水稻产量和稻米品质,而且含有对人、畜剧毒的稻曲菌毒素,对动物球形分子蛋白具有抑制效应,能够引起老鼠的肝脏、肾脏和膀胱细胞坏死。稻曲病不仅影响农作物水稻产量,

而且对人类健康构成了重大负面影响^[1-2]。

稻曲病的发生规律尚未完全清楚,对发生温度都有相佐观点。对稻曲病的研究已有较长时间,近年来国家、省、市(区)立项研究主要在致病菌类型及分子机制等方面有阶段性结论,但生产上如何采取切实可行的高效防控措施还没有定论。达成共识的是不同水稻品种抗病性和不同杀菌剂品种对稻曲病的防控效果具有明显差异。笔者开展稻曲病田间简易接种方法研究,为水稻新品种推广应用、杀菌剂新品种筛选提供保障。

1 材料与方法

1.1 稻曲球采集保存

2014 年、2017 年江苏省盐城市大面积生产上水稻稻曲病发生极少,寻找发病重的田块采集稻曲球(表 1),为下年试验作准备,各采集 300 粒稻曲球带入选入江苏沿海地区农业科学研究所(盐城市亭湖区)工作室自然晾干,装入塑料袋于室内常温下保存。

1.2 水稻种植

为提高试验接种效果,于 2015 年选择高感稻曲病的盐稻 10 号^[3-4],2018 年选择生产上常见发生

收稿日期:2019-01-17

基金项目:国家重点研发计划(编号:2016YFD0200805);江苏省自然科学基金(编号:BK20141264)。

作者简介:张俊喜(1966—),男,江苏盐城人,研究员,主要从事大宗农作物病虫害防治应用研究。Tel:(0515)68668961;E-mail:yckzjx@sohu.com。

通信作者:葛兆建,硕士,研究员,主要从事农业资源与环境研究。Tel:(0515)68668893;E-mail:yckjnc@163.com。

[9]方中达. 植病研究方法[M]. 北京:农业出版社,1979:153-154.

[10]Leslie J F, Summerell B A. The *Fusarium* laboratory manual[M]. Ames, IA: Blackwell, 2006: 212-219.

[11]Kriaa M, Hammami I, Sahnoun M, et al. Biocontrol of tomato plant diseases caused by *Fusarium solani* using a new isolated *Aspergillus tubingensis* CTM 507 glucose oxidase [J]. Comptes Rendus

Biologies, 2015, 338(10): 666-677.

[12]Tomioka K, Hirooka Y, Takezaki A, et al. Fusarium root rot of prairie gentian caused by a species belonging to the *Fusarium solani* species complex[J]. Journal of General Plant Pathology, 2011, 77(2): 132-135.

[13]赵杰,王静,李乃会,等. 烟草镰刀菌根腐病病原菌致病粗毒素的研究[J]. 植物保护, 2013, 39(3): 61-66.