

# 毛竹菱斑病病原菌的分离与鉴定

王海霞, 彭九生, 刘易鑫

(江西省林业科学院, 江西 南昌 330032)

**摘要:** 采用致病性测定、形态学观察和ITS-rDNA序列分析方法对井冈山毛竹菱斑病病原进行了研究。从108块毛竹病斑组织中分离获得30株真菌, 选择分离频率高的菌株为研究对象, 结合ITS-rDNA序列分析鉴定, 将其归属于*Fusarium oxysporum*、*Alternaria alternate*、*Arthrinium sp.*、*Gibberella zeae* 和*Xylaria sp.* 5个属。经过室内和田间有伤接种致病性测试证实, 尖孢镰刀菌、链格孢菌、节菱孢属菌、赤霉病菌和炭角菌属均具有致病性, 其中尖孢镰刀菌的致病性最强, 分离相对频率最高, 初步推断其主要致病菌类群。

**关键词:** 毛竹; 尖孢镰刀菌; 病原菌; ITS

## Isolation and identification on pathogen of Moso Bamboo

Wang Haixia<sup>1</sup>, Peng Jiusheng<sup>1</sup>, Liu Yixing<sup>1</sup>, Zhang Zhibin<sup>2</sup>

(1. Jiangxi Academy of Forestry, Nanchang 330032, Jiangxi, China; 2. Jiangxi Normal University, Nanchang 330022)

**Abstract:** The pathogens of bamboo disease were identified on the basis of pathogenicity testing, as well as morphological characters and internal transcribed spacer of ribosomal DNA (rDNA) sequence analysis. A total of 30 possible pathogenic fungal isolates were isolated from 108 pieces of diseased bamboo tissues. Based on pathogenicity experiments, the results showed that *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternate*, *Arthrinium sp.*, *Gibberella zeae*, and *Xylaria sp.* were the major pathogenicity strains. Especially the *Fusarium oxysporum* which was preliminary identified as pathogen, with the highest isolation relative frequency and the same disease symptom compared with the diseased bamboo under nature conditions.

**Keywords:** *Phyllostachys heterocycla*; *Fusarium oxysporum*; Pathogen; ITS

近年来, 江西省毛竹林有一种新的发病趋势, 该病主要危害2年生以上立竹, 病状特征为竹间密布菱状病斑, 呈菱形斑块扩散于竹节间, 病斑表面呈褐色丘状突起, 周围密布粉状真菌孢子, 根据病状特征确定为真菌感染病害, 并初步定名为菱斑病。病菌由外而内逐渐深入竹腔, 导致竹秆腐烂甚至整株枯死(见图1)。这不仅破坏了毛竹林的景观效果, 也严重影响毛竹林的丰产经营, 降低了毛竹林的经济效益<sup>[1-4]</sup>。

该病首次在江西井冈山发现，目前井冈山、鹰潭、靖安等地面临大规模爆发迹象。为了有效地控制该病的发生和蔓延，笔者自2008年6月起在井冈山设置了试验林分，设立了固定样地，开展了调查、取样、病原菌分离、鉴定等一系列的研究，初步确定该病为5种真菌所致，而多菌灵、甲基立枯灵及噁霉灵等药剂对其具有不同程度的抑制作用，为今后的进一步研究奠定了基础。



图1 健康毛竹与毛竹菱斑病病变图

Fig. 1 Healthy bamboo and symptoms on bamboo with spot pathogen

## 1. 材料与方法

### 1.1 试样采集

从试验林分内采集年龄相近的发病植株病症组织，用无菌袋分装带回实验室，24 h 内对样品进行病原菌的分离。

### 1.2 病原菌的分离与纯化

取染病毛竹的竹竿病健交界处组织，灭菌后，切成0.2 cm×0.2 cm小块，置于PDA培养基上，于28° C培养箱中倒置保湿培养10~14d，每日定时观察并挑取新生菌丝尖端部分转接，纯化培养直至获得纯菌株，于4° C斜面保藏待用。

### 1.3 病原菌致病性测定

用无菌水配制 $10^8$ 个/mL的孢子悬浮液，待用。

#### 1.3.1 室内离体组织接种

接种到经75%酒精表面消毒的健康毛竹竹秆表面，设刺伤和无伤接种2个处理，每处理重复9次，以无菌水作对照，在28° C培养箱中，光照和黑暗各12h连续保湿5d，定期观察病害发生和发展情况。

#### 1.3.2 田间接种

2010年6月下旬在试验林分内随机选取年龄相近的健康毛竹进行接种，设刺伤和无伤接种2个处理，每个处理重复9次，以无菌水作对照。按室内接种方法接种后覆盖灭菌湿脱脂棉，套硫酸纸袋保湿5d，定期观察，并对接种后发病的组织进行病菌再分离。

#### 1.4 病原菌的形态学鉴定

依照真菌的经典分类鉴定方法，从纯化后培养数日的菌落上挑取菌体制成切片，置于光学显微镜下观察菌丝、孢子梗、孢子或其他繁殖体形态以及它们之间的着生关系，同时结合菌株菌落形态特征，包括形状、质地、颜色、边缘特征等情况，参考相关菌物分类学专著初步确定菌株的分类学地位<sup>[6]</sup>。

#### 1.5 病原菌rDNA ITS区扩增、测序和序列分析

将分离得到的菌株纯化培养后用CTAB方法提取DNA<sup>[7]</sup>。通用引物ITS1和ITS4扩增ITS序列<sup>[8]</sup>。PCR反应体系为：模板DNA 2 μL、10 ×PCR buffer 5 μL、*Taq* DNA聚合酶2.5 Unit、dNTP(2.5 mmol L<sup>-1</sup>) 4 μL、引物各3 μL，补充去离子水至50 μL。反应条件：94℃ 5 min；94℃ 40 s，60℃ 40 s，72℃ 40 s，34个循环；72℃ 5 min。PCR产物用1%凝胶电泳进行检测，在紫外灯照射下从凝胶中切取目的条带，经琼脂糖凝胶回收试剂盒(北京天根生物技术有限公司)纯化，连接到pGM-T载体并转化大肠杆菌DH5α后，用含X-gal和IPTG的Amp<sup>+</sup> (氨苄青霉素)抗性平板筛选后，挑取白色菌落培养经PCR初步筛选和双酶切测后，送交上海生工生物工程技术服务有限公司测序。序列提交到GenBank核酸序列数据库并得到登号，应用Blast程序对所测得的内生真菌ITS-rDNA序列进行相似性比对。采用软件ClustalX 1.81进行多序列的比较，比对结果采用MEGA 4.0软件进行系统进化树的构建。

## 2. 结果与分析

### 2.1 菌株的分离和多样性

在总共108块毛竹病斑组织中有103块被真菌侵染，分离获得真菌30株。选择分离频率高的菌株用于分子鉴定，将形态种ITS-rDNA测序后经BLAST比对，MEGA4.0构建Neighbor-joining系统进化树(图2)，将其归属为*Gibberella*、*Fusarium*、*Arthrinium*、*Xylaria*和*Alternaria* 5个属6个种。其中，来自于*Fusarium oxysporum*、*Alternaria alternata*和*Gibberella zeae*的菌株分离的相对频率较高，分别为20%、13.33%和10%。

表1 真菌的种群、数量和相对频率

Table1 Population quantity, No. of isolates, and relative frequency of the fungal strains

Taxon	No. of isolates	Relative frequency
<i>Gibberella zeae</i>	3	10

<i>Arthrinium sp.</i>	1	3.33
<i>Xylaria sp.</i>	2	6.67
<i>Alternaria alternata</i>	4	13.33
<i>Fusarium oxysporum</i>	6	20

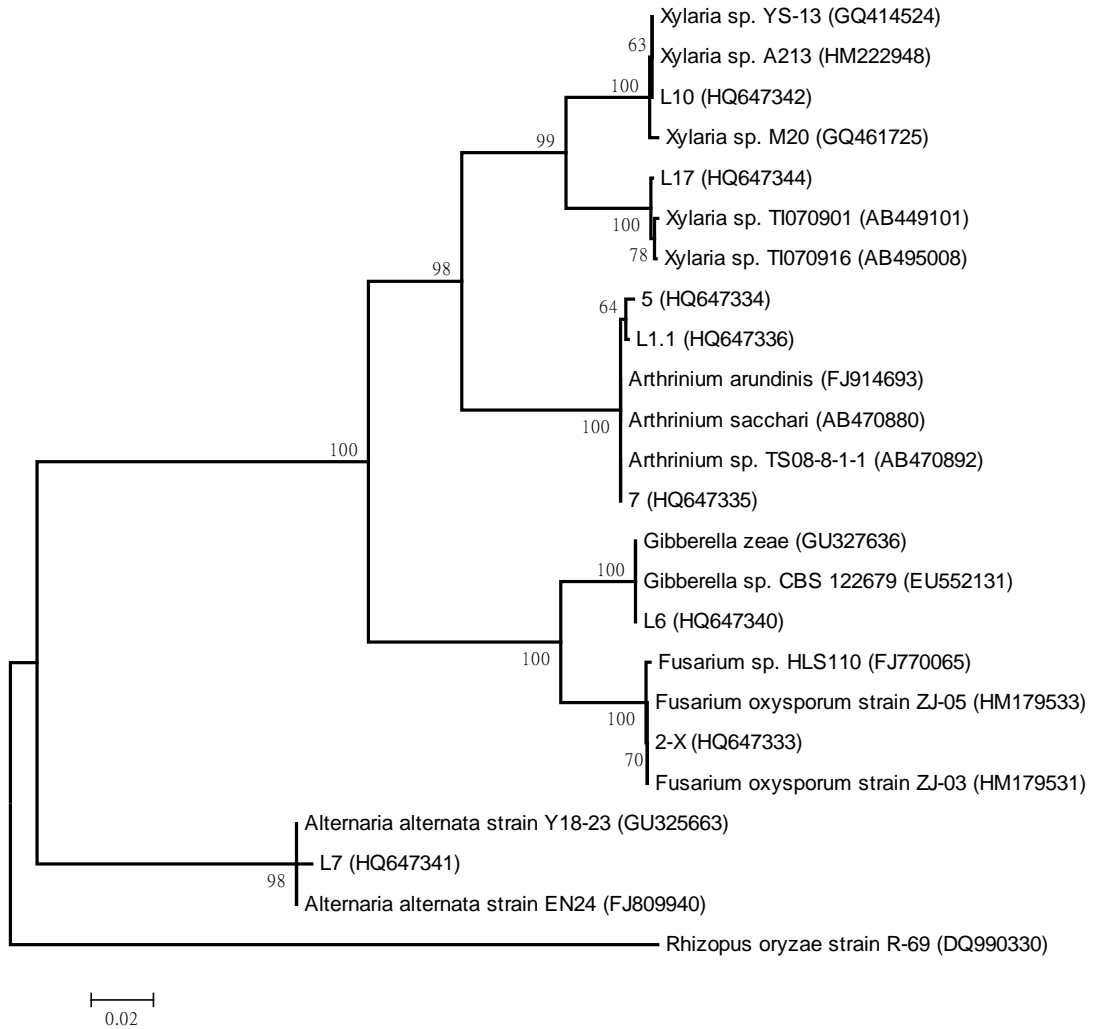


图 2 基于 ITS 序列的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of fungus based on the sequence of ITS

Note: Data in parentheses are the GenBank accession numbers. The numbers at the nodes indicate the levels of bootstrap support (%) based on 1000 resampled data sets. The scale bar represents 0.02 substitutions per nucleotide position

## 2.2 菌株的致病性

室内离体组织接种实验显示来自于尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、链格孢菌(*Alternaria alternata*)、节菱孢属菌(*Arthrinium sp.*)、赤霉病菌(*Gibberella zeae*) 和炭角菌属(*Xylaria sp.*)的菌株有伤接种毛竹都具有致病性(表 2)。其中菌株 2-X 致病性最强, 经室内接种的毛竹在发病初期产生水渍状斑点, 然后逐渐扩展成方形, 褐色, 最后表面分布白色的气

生菌丝 (图 3); 13-15d 后刺伤接种的毛竹组织发病率达到 100%。



图3 室内病原菌致病测试 (左边为空白, 右边为病原菌2-X)

Fig. 3 Test inoculated bamboo in the lab (control test of left, pathogen 2-X test of right)

田间接种的毛竹在 30d 后, 经刺伤接种的毛竹平均发病率 85%, 其症状与自然发生的症状相似, 但是病斑比自然状态下发病产生的病斑小(图 4), 自然状态下发病的毛竹, 病斑大小为(4.0~8.0)mm×(5.0~15.0)mm(图 1)。此外在室内或田间接种试验中, 无伤接种和对照均不发病。对接种发病后的病斑再次进行病菌的分离, 均能获得与原分离菌株一致的病原菌。



图 4 田间病原菌致病测试 (左边为空白对照, 右边为病原菌 2-X)

Fig. 4 Test inoculated bamboo in the field (control test of left, pathogen 2-X test of right)

表 2 真菌致病性测定结果

Table 2 Pathogenicity results of the fungal

Strains	GenBank accession No.	Taxon	Closest relatives in NCBI (GenBank accession No.)	Max identity (%)	致病性*	
					离体	体内
2-X	HQ647333	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> (HM179531)	99	+++	+++
L1.1	HQ647336	<i>Arthrinium sacchari</i>	<i>Arthrinium sacchari</i> (AB470880)	99	+	+
5	HQ647334	<i>Arthrinium sacchari</i>	<i>Arthrinium sacchari</i> (AB470880)	99	++	+
7	HQ647335	<i>Arthrinium</i> sp.	<i>Arthrinium sacchari</i> (AB470880)	99	+	+
L6	HQ647340	<i>Gibberella zeae</i>	<i>Gibberella zeae</i> (HM769950)	99	+	+
L7	HQ647341	<i>Alternaria alternate</i>	<i>Alternaria alternata</i> (GU325663)	99	+	+
L10	HQ647342	<i>Xylaria</i> sp.	<i>Xylaria</i> sp. (GQ414524)	99	++	++
L17	HQ647344	<i>Xylaria</i> sp.	<i>Xylaria</i> sp. (AB495008)	98	++	+

\*+: 病斑大小1~4mm; ++: 病斑大小5~8mm; +++: 病斑大小9~12mm.

### 3. 讨论

通过对以上研究可知,尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、链格孢菌(*Alternaria alternate*)、节菱孢属菌(*Arthrinium* sp.)、赤霉病菌(*Gibberella zeae*)和炭角菌属(*Xylaria* sp.)为致病菌。其中以尖孢镰刀菌的致病性最强,分离的相对频率也最高,并且有伤接种毛竹后发病毛竹的症状与自然环境中基本一致,初步确定为井冈山毛竹菱斑病的主要病原菌。

进一步田间有伤接种实验发现,接种病斑大小均不同程度的小于当地自然发病的病斑,这可能是在自然状态下,多种致病真菌协同作用,5种真菌共同或先后单独侵染所致,对这5种病原菌的侵染过程及致病机制尚需进一步研究。这一研究结果对井冈山毛竹菱斑病发生规律及制定切实有效的综合防治措施提供了重要的参考依据。

此前有关 *Fusarium oxysporum* 作为植物病害真菌被分离和鉴定已有不少报道:李勇等<sup>[9]</sup>在对北京地区柴胡根腐病的病原菌进行分离和鉴定时发现 *Fusarium oxysporum* 为其病原菌;张扬<sup>[10]</sup>等在对延庆甘蓝枯萎病病原菌的鉴定中确定 *Fusarium oxysporum* 为其病原菌。也有研究表明,镰刀菌属的菌株还能引发毛竹基腐病和腐烂病等多种竹类病害<sup>[11]</sup>。发生在井冈山地区的毛竹菱斑病的病原菌是否与国内其他毛竹生产基地的情况一致,需要进行更大范围的危害样本采集和进行系统病原学研究,目前有关该病害的侵染过程及其相关防治技术的研究正在进行中。

## 参考文献:

- [1] 林长春. 毛竹枯梢病的研究进展[J]. 竹子研究汇刊, 2003, 22 (2): 25~29.
- [2] 薛振南, 黄式玲, 周芳琳, 等. 毛竹丛枝病病原研究[J]. 广西农业生物科学, 2007, 26(3), 256~261.
- [3] 贾克锋, 汪剑林, 黄勇军, 等. 毛竹基腐病发生状况及防治对策[J]. 浙江林业科技, 2002, 22(4), 69~72.
- [4] 毛石禧. 毛竹轻度枯梢病防治效果研究[J]. 竹藤保护 2007, 5(1): 43~45.
- [5] 方中达. 植病研究方法[M]. 第3版. 北京: 北京农业出版社, 1998.
- [6] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1979.
- [7] Guo LD, Hyde KD, Liew ECY. Identification of endophytic fungi from *Livistona chinensis* based on morphology and rDNA sequences [J]. *New Phytol*, 2000, 147: 617~630.
- [8] Jin SL, Kwan SK, Hack SJ. Phylogenetic analysis of *Xylaria* based on nuclear ribosomal ITS1-5.8S-ITS2 sequences [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2000, 187: 89~93.
- [9] 李勇, 刘时轮, 丁万隆, 等. 北京地区柴胡根腐病的病原菌鉴定[J]. 植物病理学报, 2009, 39(3): 314~317.
- [10] 张扬, 郑建秋, 马永军, 等. 甘蓝枯萎病病原菌的鉴定[J]. 植物病理学报, 2008, 38(4): 337~345.
- [11] 徐梅卿, 戴玉成, 汪来发, 等. 中国竹类病害记述及其病原物分类地位 [J]. 林业科学研究, 2006, 19(6)