

DOI:10.13718/j.cnki.zwyx.2023.01.006

青海省民和县青贮玉米叶斑病及其病原调查初报

王杰¹, 王海春², 祁鹤兴¹, 刘欣悦¹,
常建萍¹, 杜雪花¹, 芦光新¹

1. 青海大学 农牧学院, 西宁 810016;
2. 青海省草原总站, 西宁 810003

摘要: 为调查青海省民和县玉米叶斑病病原菌种类, 从该地区玉米种植地采集具有典型叶斑病症状的玉米病叶, 通过叶斑病症状观察分类, 采用组织分离法获得菌株, 并从分离的菌株中选取具有代表性的菌株进行分子鉴定。结果表明, 青海省民和县玉米种植地玉米叶斑病症状主要分为3类, 第1类病斑不规则, 较大, 呈现褐黄色; 第2类病斑呈长条形, 中央部分呈现黄褐色, 边缘是紫褐色或深褐色, 有2~3层同心轮纹, 且能侵染叶脉部分; 第3类病斑呈长方形或菱形, 病斑较大。共分离到14株菌株, 经rDNA-ITS序列分析发现, 引起玉米叶斑病的病原菌分别为交链格孢(*Alternaria alternata*)、*A. burnsii*、细级链格孢(*A. tenuissima*)、层出镰刀菌(*Fusarium proliferatum*)、三线镰刀菌(*F. tricinctum*)和*F. longifundum*。引起青海省民和县玉米叶斑病的病原菌分别隶属于2属6种, 病原菌主要为链格孢属真菌。

关键词: 青贮玉米; 叶斑病; 链格孢属病原菌;

rDNA-ITS 序列分析

中图分类号: S435.131

文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



文章编号: 2097-1354(2023)01-0044-06

Preliminary Report on Leaf Spot and Pathogens of Silage Maize in Minhe County of Qinghai Province

WANG Jie¹, WANG Haichun², QI Hexing¹, LIU Xinyue¹,
CHANG Jianping¹, DU Xuehua¹, LU Guangxin¹

1. College of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining 810016, China;
2. Head Station of Grassland of Qinghai Province, Xining 810003, China

收稿日期: 2022-10-20

基金项目: 2022年中央财政林业和草原生态保护恢复资金项目“青海省牧草病害种类及分布调查”; 2021年度青海省/昆仑英才“高端创新创业人才”计划项目。

作者简介: 王杰, 硕士研究生, 主要从事草地微生物多样性研究。

通信作者: 祁鹤兴, 副教授, 博士。

Abstract: To investigate the pathogen species of silage maize leaf spot in Minhe County, the diseased leaves with typical symptoms were collected from the corn planting area. The diseased leaves were classified according to the symptoms. The strains of pathogen were obtained by tissue isolation method, and the isolates were identified by molecular biology method. The results showed that there were three types of leaf spots observed in Minhe County. The first type of spot was irregular, large lesions, in brownish yellow color. The second type of spot was long strip, yellow brown in the center, or purple brown or dark brown in the edge, sometimes with 2~3 concentric rings, and the vein could be infected. The third kind of lesions were oval, slightly larger, yellow, scattered on the leaves. Fourteen isolates were isolated and identified by rDNA-ITS sequence analysis as *Alternaria alternat*, *A. burnsii*, *A. tenuissima*, *Fusarium proliferatum*, *F. tricinctum* and *F. longifundum*. The pathogens caused corn leaf spot in Minhe County belonged to 2 genera, 6 species, respectively. The main pathogens are *Alternaria*.

Key words: silage maize; leaf spot; *Alternaria* pathogens; rDNA-ITS sequence analysis

玉米广泛分布于热带和温带地区,是目前世界上分布最广泛、最高产的谷类粮食作物之一,同时也是重要的食品、医药和畜牧业的优质饲料.我国不仅是玉米的主要生产国,也是玉米的主要消费国,自 20 世纪 70 年代后期,中国玉米主产区呈现不断扩张的趋势,使玉米从第三大粮食作物晋升为第一大粮食作物^[1].随着中国养殖业的发展,对青贮玉米的需求量与日俱增,青贮玉米育种已成为中国玉米育种的重要途径之一^[2-4].以往的研究报道中,研究者对青贮玉米品种种植密度和抗病性进行分析后发现,随着种植密度的增加,大斑病、小斑病、矮花叶病和丝黑穗病等都呈加重趋势^[5-8].这些病害主要通过侵染玉米叶片导致玉米过早枯死,严重影响了玉米的产量和品质^[9-10].

玉米叶斑病可发生在玉米的各个生长周期^[11].玉米叶片上的病斑常较小且密集,病斑形状大多呈椭圆形、长方形或梭形,发病严重时,病斑可连在一起形成大面积的坏死叶斑^[12-13];还可进一步导致玉米植株矮小细弱、果穗瘦小和籽粒干瘪,对于玉米的生长发育产生严重的负面影响,造成玉米产量的下降.

在我国,已报道的可引起玉米叶斑病的病原菌种类就多达十几种,发生的病害类型也有 10 余种^[14-16].其中,早在 1984 年段双科^[17]就首次报道了玉米弯孢菌叶斑病的发生,但未分离到其病原菌,1995 年赵来顺等^[18]鉴定病原菌为新月弯孢菌,后由戴法超等^[19]将这种叶斑病命名为玉米弯孢菌叶斑病.玉米叶斑病的病原菌从侵入到产生分生孢子传播,为害时间很短,容易在生产上大面积暴发流行.近年来,随着我国“粮改饲”和“草牧业”的发展,玉米成为我国畜牧养殖业特别是设施养殖业中应用最为广泛的饲草之一.

近年来,玉米叶斑病在我国不断蔓延,已成为制约我国玉米安全的主要病害之一.随着农业种植结构的调整,青海省青贮玉米种植面积增大,在民和县等海东地区也有叶斑病发生,但研究报道较少.基于此,本研究于 2018—2019 年在青海省民和县玉米种植地进行了玉米叶斑病的初步调查,并在室内开展了病原分离和鉴定,旨在了解为害青海省民和县青贮玉米的叶部病原物的种类,为玉米病害的防治奠定基础.

1 材料与方法

1.1 病害样品采集地概况

本研究病害样品采集地位于青海省民和县,地处湟水谷地,地貌以山地沟谷地为主,湟水、

黄河自西向东分别流经民和县北境和南境,大通河自北向南流经民和县北境和南境,属高原大陆性干旱气候,年均温度 9℃,年降水量为 292.2 mm 左右,无霜期 198 d,全县农作物主要有小麦、豌豆和玉米.民和县气候温和,阳光充足,资源丰富,是青海省重要的粮食、蔬菜和瓜果主产区.

1.2 试验材料

1.2.1 供试玉米样品采集

选择青海省民和县玉米叶斑病发病严重的地块,采集每个植株的发病叶片,进行症状辨析后弃去非病原物引起的植株叶片.

1.2.2 培养基

PDA 培养基为马铃薯葡萄糖琼脂培养基,包含马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 16 g 和蒸馏水 1 000 mL.

1.2.3 试验仪器

本试验所用仪器主要包括打孔器、培养皿、锥形瓶、超净工作台、电子天平、摇床、恒温培养箱、冰箱、高压蒸汽灭菌锅、电子显微镜、水浴锅、酒精灯、剪刀、镊子和混合式研磨仪(Retsch MM400).试剂盒采用 Fisher Scientific 公司的试剂盒(Lab Serv-24).

1.3 试验方法

1.3.1 青贮玉米叶斑病样本的采集

选择青海省民和县玉米叶斑病发病比较严重的地块进行采样;发病植株上的发病叶片,从下至上每个植株采集 3 个叶片进行症状辨析,弃去非病原物引起的植株叶片.根据玉米叶斑病症状进行进一步分类.

1.3.2 病原菌株的分离培养

采用直接检查发病叶片病原物和常规组织分离法相结合,选择样品中有典型症状的病叶,在病斑的病健交界处剪取组织块,用 75%酒精消毒 1 min,0.1%升汞消毒 0.5 min,再用无菌水冲洗,置于 PDA 培养基上,放入培养箱在(25.0±0.5)℃温度条件下培养,等到菌落形成后,用 PDA 培养基再次纯化、保存.

1.3.3 rDNA-ITS 分子鉴定

菌株 DNA 提取:将菌株接种到 PDA 平板上,25℃培养,待菌株长满平板后取菌丝,用混合式研磨仪(Retsch MM400)破碎菌丝后,采用 Kingfisherduo 磁珠纯化系统和基因组 DNA 提取试剂盒(SK1375)进行 DNA 提取.

PCR 反应:以基因组 DNA 为模板,利用 1 对 rDNA-ITS 通用引物(ITS-1、ITS-4)进行 PCR(ITS-1: 5'-GTAGGTGAACCTGCGG-3',ITS-4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3').PCR 反应程序:预变性 95℃ 5 min,变性 95℃ 1 min,复性 50℃ 1 min,延伸 72℃ 1 min,35 个循环,最终 72℃延伸 10 min.引物合成、序列测定均由上海生工生物工程有限公司完成.

基因序列的比对及系统发育树构建:扩增产物纯化后,送样测定 DNA 序列.将测序获得的 rDNA-ITS 序列通过与 GenBank 中的核酸数据库序列进行 Blastn 分析,采用 CLUSTAL 软件进行多重序列比对,并用 MEGA 6.0 软件采用 Neighbor-Joining 法和 UPGMA 法构建系统发育树.

2 结果与分析

2.1 青贮玉米叶斑病症状观察

通过对青海省民和县采集的青贮玉米叶斑病害样本症状进行观察,发现民和县青贮玉米叶

斑病症状主要分为3种类型.第1类斑点不规则,病斑较大,呈现黄褐色(图1A);第2类病斑呈长条形,中央部分呈现黄褐色,边缘是紫褐色或深褐色,有2~3层同心轮纹,且能侵染叶脉部分(图1B);第3类病斑呈长方形或菱形,病斑较大(图1C).



图1 分离到链格孢属和镰刀菌属的玉米叶斑病样本

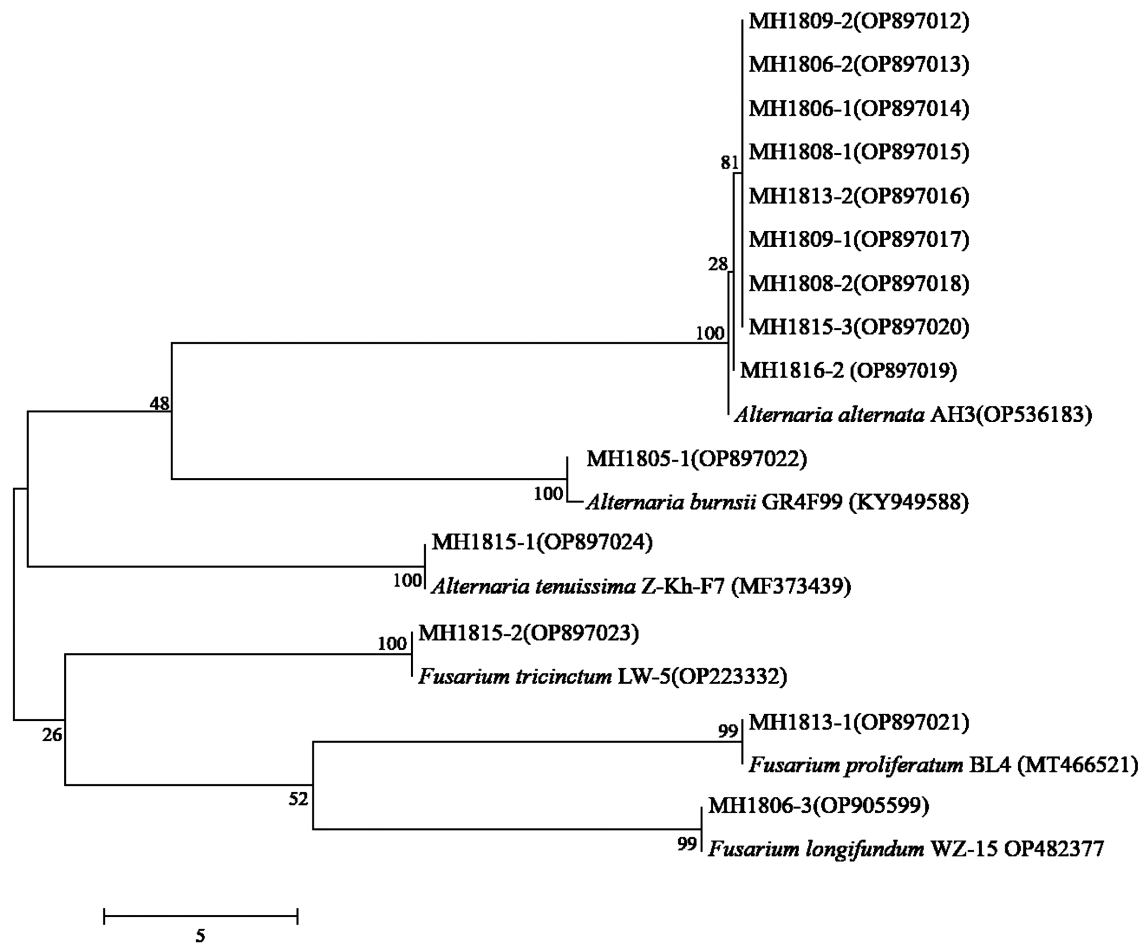
2.2 青贮玉米叶斑病病原菌分离及其形态特征

采用组织分离法从青贮玉米发病叶片分离病原菌株,从青海省民和县团结村采集的样品中共获得14株病原真菌,经形态观察发现分属于链格孢属和镰刀菌属.11株菌株MH1809-1, MH1808-2, MH1813-2, MH1808-1, MH1806-1, MH1809-2, MH1806-2, MH1815-3, MH1816-2, MH1805-1和MH1815-1为链格孢属真菌,气生菌丝棉絮状或垫状,菌落呈灰白色至深褐色,分生孢子黄褐色至褐色,有横、纵隔.3株菌株MH1813-1, MH1815-2和MH1806-3为镰刀菌属真菌,气生菌丝棉絮状,菌落白色至浅红色,大型分生孢子发达,镰刀状,1~5个隔膜;小型分生孢子卵圆形,无色,0~1个隔膜.

2.3 青贮玉米叶斑病菌 rDNA-ITS 序列系统发育分析

对14株菌株进行rDNA-ITS序列扩增和测序,测序结果与NCBI中已有序列进行同源序列(BLAST)比对,最终明确分离所得菌株与数据库中现存的已知菌之间的相似程度.经分子生物学鉴定发现,在青海省民和县引起玉米叶斑病害的主要病原菌是链格孢属真菌,占78.5%,其次是镰刀菌属真菌,占21.4%.

对构建的系统发育树进行分析发现, MH1809-2, MH1806-2, MH1806-1, MH1808-1, MH1813-2, MH1809-1, MH1808-2, MH1815-3和MH1816-2与GenBank中已经登录的序列号为OP536183的交链格孢 *Alternaria alternata* AH3的同源性达99%,聚为同一发育分支,亲缘关系最近,这9株菌株鉴定为交链格孢.菌株MH1805-1与GenBank中已经登录的序列号为KY949588的 *Alternaria burnsii* GR4F99的同源性达99%,亲缘关系最近,该菌株鉴定为 *Alternaria burnsii*.菌株MH1815-1与登录号为MF373439的细级链格孢 *Alternaria tenuissima* Z-Kh-F7聚为一个发育分支,亲缘关系最近.菌株MH1815-2, MH1813-1和MH1806-3分别与GenBank中已有菌株三线镰刀菌 *Fusarium tricinctum* LW-5、层出镰刀菌 *Fusarium proliferatum* BL4和 *Fusarium longifundum* WZ-15的同源性达99%以上,亲缘关系最近.因此,菌株MH1815-2为三线镰刀菌,菌株MH1813-1为层出镰刀菌,菌株MH1806-3为 *Fusarium longifundum*(图2).



括号内为 GenBank 登录号。

图2 链格孢属和镰刀菌属真菌基于 rDNA-ITS 序列构建的 NJ 树

3 结论与讨论

本研究收集了青海省民和县地区青贮玉米叶斑病样本,并对其病原体进行了分离鉴定.青海省民和县青贮玉米种植地玉米叶斑病病斑形态主要分为3类,共分离到14株菌株,经鉴定,病原菌分别为交链格孢、*A. burnsii*、细级链格孢、三线镰刀菌、层出镰刀菌和*F. longifundum*.引起青海省民和县玉米叶斑病的病原菌分别隶属于2属6种真菌,即交链格孢、*A. burnsii*、细级链格孢、层出镰刀菌、三线镰刀菌和*F. longifundum*;其中,引起青海省民和县玉米叶斑病的主要病原菌为链格孢属.根据各种真菌分离到的频率判断,不规则病斑主要由链格孢属引起.长方形或菱形病斑主要是由镰刀菌属引起的.本研究分离到的样品病斑大多呈梭形,与玉米大斑病引起的病斑形状相似,玉米叶片上的小点状病斑,也可能与玉米品种、生育期和温、湿度等因素有关,其致病性和在田间的发生情况值得进一步研究.

链格孢属(*Alternaria*)是一类极为常见的真菌,多种链格孢属真菌是农作物的主要致病菌之一,也是重要的一种植物病原菌,它能引起包括玉米、小麦、烟草、马铃薯、番茄、苹果、梨等几十种农作物发生病害,如黑斑病、褐斑病、叶斑病、赤星病等,严重影响农作物的产量,给我国农业生产带来了巨大损失^[20].本研究结果表明,引起青海省民和县玉米叶斑病害的主要病原真菌是链格孢属.

真菌引起的玉米叶斑病,存在同一病原引起的症状差别很大和不同病原引起相似症状的特

点,同时还存在 2 种及以上病原菌复合侵染的情况.所以仅通过叶斑病的症状有时还难以判断病原菌的种类.本研究通过对青海省民和县玉米不同类型叶斑的病原菌进行分离和鉴定,明确其主要的病原菌种类,为此类病害的正确诊断提供了依据和资料;但同时由于本研究采集样本较少且采集的叶片叶斑病症较为单一,后期可通过采集更多不同症状的样本对民和县玉米叶斑病害病原真菌进行进一步详细的研究.

参考文献:

- [1] 郭庆海. 中国玉米主产区的演变与发展 [J]. 玉米科学, 2010, 18(1): 139-145.
- [2] 吕国忠, 陈捷, 白金铠, 等. 我国玉米病害发生现状及防治措施 [J]. 植物保护, 1997, 23(4): 20-21.
- [3] 王晓鸣, 晋齐鸣, 石洁, 等. 玉米病害发生现状与推广品种抗性对未来病害发展的影响 [J]. 植物病理学报, 2006, 36(1): 1-11.
- [4] 于明彦, 徐国良, 李淑华, 等. 玉米叶斑病的发生及防治技术 [J]. 现代化农业, 2011(11): 51-53.
- [5] 戴法超, 王晓鸣, 朱振东, 等. 玉米弯孢菌叶斑病研究 [J]. 植物病理学报, 1998, 28(2): 123-129.
- [6] 戴法超. 玉米病害与玉米种质资源抗病性 [J]. 作物品种资源, 1997(4): 27-30.
- [7] MALCLM C. Compendium of Corn Diseases Secon d Printing[M]. Minnesota: The American Phytopathological Society, 1984.
- [8] 刘兰浩, 孙阳, 穆平, 等. 部分玉米种质资源对弯孢菌叶斑病的抗性评价 [J]. 玉米科学, 2008, 16(3): 126-129.
- [9] 林红, 孙德全, 潘丽艳, 等. 东北地区部分玉米品种资源抗玉米弯孢菌叶斑病鉴定研究 [J]. 黑龙江农业科学, 2006(4): 6-10.
- [10] 梅丽艳, 郭梅, 李志勇. 玉米弯孢菌叶斑病病原菌与症状的初步研究 [J]. 黑龙江农业科学, 2003(3): 5-7.
- [11] 杨春梅. 玉米病虫害防治技术探析 [J]. 农民致富之友, 2019(11): 79.
- [12] 李宏程, 王丽艳. 东北地区玉米病害防治技术 [J]. 农业与技术, 2015, 35(3): 95, 97.
- [13] 刘孝忱, 于洪蛟, 梁晓斐. 东北地区玉米主要病害防治技术分析 [J]. 神州, 2013(29): 48.
- [14] 张春平. 东北地区玉米主要病害及防治方法 [J]. 现代农业科技, 2017(11): 115, 119.
- [15] 郭玉杰, 牛永春, 邓晖. 我国北方玉米上平脐蠕孢属和弯孢属真菌及其所致叶斑病 [J]. 植物保护, 2016, 42(5): 39-46.
- [16] 段鹏飞, 刘天学, 李潮海. 河南玉米叶斑病发生的区域特征 [J]. 河南农业大学学报, 2010, 44(2): 196-201.
- [17] 段双科. 玉米自交系黄早四“黄斑病”的调查研究 [J]. 植物保护, 1984, 10(6): 12.
- [18] 赵来顺, 田学军, 李玉琴, 等. 玉米黄斑病研究 I · 病原菌鉴定 [J]. 河北农业大学学报, 1995, 18(2): 43-45.
- [19] 戴法超, 高卫东, 王晓鸣, 等. 玉米弯孢菌叶斑病的初步研究简报 [J]. 植物保护, 1996, 22(4): 36-37.
- [20] 崔迪, 王继华, 陈捷, 等. 链格孢属真菌对农作物的危害 [J]. 哈尔滨师范大学自然科学学报, 2005, 21(4): 87-91.

责任编辑 苏荣艳