

海滨雀稗弯孢霉叶斑病病原鉴定及生物学特性研究

林 江,王红星,赵庆杰,张一恒

(海南大学 应用科技学院,海南 儋州 571737)

摘要:弯孢霉叶斑病是高尔夫草坪养护管理中的一种重要病害,为明确该病害的致病病原及相关特性,对海滨雀稗弯孢霉叶斑病的病原进行了种类鉴定、致病性测定和生物学特性研究。结果表明:海滨雀稗弯孢霉叶斑病致病菌为新月弯孢霉[*Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn];该菌菌丝生长最适温度为 30℃,pH 为 7,不同光照对菌丝生长无明显影响,以麦芽糖为碳源、蛋白胨为氮源比较适合菌丝的生长。

关键词:海滨雀稗;弯孢霉属;生物学特性

中图分类号:S688.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2015)10-0093-06 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2015.10.0093

海滨雀稗(*Paspalum vaginatum*)又名夏威夷草,属禾本科、雀稗属草本植物,原产于热带、亚热带海滨地区。因其具有极强的耐盐性和较强的耐旱性、耐寒性和耐荫性,且色泽亮丽、坪质细腻、分蘖密度高、生长旺盛等特点,整体景观效果优于常用的狗牙根[*Cynodon dactylon* (Linn.) Pers.]和结缕草(*Zoysia japonica* Steud.),目前在中国南方及过渡性地带的高尔夫球场被广泛应用于发球台、球道和长草区^[1-3]。海滨雀稗已成为草坪业中最具发展潜力的暖季型草坪草种。近年来,关于海滨雀稗的研究主要集中于抗盐碱、抗寒抗旱性、基本生物学特性及相关水肥管理方面的研究^[4-8]。随着海滨雀稗在草坪中的应用面积不断增大,病害问题日渐突出,李昆等报道显示在海滨雀稗养护管理过程中主要以币斑病、褐斑病、叶斑病、镰刀菌枯萎病及线虫发生较多。张兆松等则对海滨雀稗上所发生的币斑病的病害识别和田间防治进行了详细研究^[9-13]。弯孢属为真菌界半知菌亚类一种常见病原菌,相关研究报道显示,该属真菌可危害玉米、大麦、燕麦、水稻、黑麦、高粱、甘蔗、小麦、草坪草等多种禾本科植物,感病植株常引起叶斑、种子变色和苗枯等症状,是目前引起草坪草种弯孢霉叶斑病的一类重要病原菌^[14-18]。经过海南高尔夫球场的常见调查采样,在海南多个高尔夫球场中所种植的海滨雀稗均发生由该属病原菌引起的病害,严重时造成球场草坪大面积

枯死,形成枯斑。虽能初步判断其病害为弯孢霉叶斑病,但关于该病的具体病原菌在海滨雀稗上的系统研究鲜见报道。本试验对海滨雀稗弯孢霉叶斑病的症状特征和病原菌形态进行了描述,结合病原形态学对病原菌进行了鉴定,同时对病原菌的生物学特性进行了系统研究,旨在为海滨雀稗弯孢霉叶斑病的症状识别和田间防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试病样 试验分离所用病样均采集于海南大学应用科技学院(儋州校区)高尔夫草坪教学实习基地中发病的海滨雀稗植株。

1.1.2 供试药品 葡萄糖、L-谷氨酸、磷酸二氢钾、氢氧化钠、甘露醇、硝酸铵、硝酸钾、氯化钾、蔗糖、硫酸镁、脲(尿素)、硫酸钙、硝酸钠、碳酸氢钠、硫酸铁、可溶性淀粉均为分析纯,由广州化学试剂厂生产;麦芽糖、琼脂粉、胰蛋白胨均为生化试剂,由国药集团化学试剂有限公司生产。

1.2 方法

1.2.1 海滨雀稗弯孢霉叶斑病症状描述 通过球场观察海滨雀稗弯孢霉叶斑病的典型症状,记录其发病特点,并对典型症状进行拍照。

1.2.2 海滨雀稗弯孢霉叶斑病病原分离及致病性测定 将球场发病的海滨雀稗叶片带回实验室后,采用常规组织分离法分离^[19]。取病健交界处的叶片组织,接种到 PDA 培养基上,置于 25℃ 生化培养箱中,培养 5 d,期间取样进行镜检。处理后用接种环挑取较纯菌落,重复上述步骤进行纯化,并对纯化后菌落、菌体进行形态描述和显微拍照。采用温室盆栽苗菌饼接种方式进行致病性测

收稿日期:2015-05-15

基金项目:海南大学基金资助项目(Hyk-1307、Hyk-1513);海南大学 2014 年度实践育人教改资助项目

第一作者简介:林江(1987-),男,贵州省毕节市人,硕士,助教,从事农业有害生物综合治理研究。E-mail:linjiang19870417@163.com。

定,先于球场中选取生长健康的海滨雀稗幼苗种植于经灭菌处理的基质中(田间土壤和细沙按5:5体积混匀),于25℃温室下保持湿润培养15 d后备用。用打孔器在纯化培养5 d的菌落边缘打取5 mm直径菌饼,将菌饼置于刺伤的海滨雀稗叶片上,每片叶接种1个菌饼,每个盆栽接种10个,共3盆。接种后套袋保湿,以接种不带菌的培养基块作为对照,定期观察发病情况,并进行记录。观察之后对接种发病的叶片再次进行分离病原菌,以完成柯赫氏法则。

1.2.3 海滨雀稗弯孢霉叶斑病病原鉴定 将纯化后的病原菌在PDA培养基上25℃培养产孢后,制作临时玻片在光学显微镜下观察。根据菌丝形态、分生孢子的大小、形态、颜色等相关特征。查阅相关文献进行比对后,确定病原菌的分类地位^[16-23]。

1.2.4 海滨雀稗弯孢霉叶斑病病原生物学特性研究 ①不同温度对菌丝生长的影响:在生长良好的菌落边缘用直径5 mm的打孔器打取菌丝块,接种于PDA培养基上(直径9 cm),置于10、15、20、25、30、35、40℃ 7个不同温度中进行培养,每个处理重复5次。培养7 d后用十字交叉法测量菌落直径。

②不同pH对菌丝生长的影响:将PDA培养基灭菌后,在无菌条件下用灭菌的0.1 mol·L⁻¹ HCl和0.1 mol·L⁻¹ NaOH溶液将培养基pH分别调节至2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0共11个pH梯度。用打孔器打取直径5 mm菌丝块接种于不同pH的PDA培养基上(直径9 cm),置于25℃中进行培养,每个处理重复5次。培养7 d后用十字交叉法测量菌落直径。

③不同碳源对菌丝生长的影响:以Czapek培养基(2.00 g KNO₃、1.00 g KH₂PO₄、0.5 g KCl、0.5 g MgSO₄·7H₂O、0.01 g FeSO₄、30.0 g 蔗糖、1 000 g 蒸馏水)为基础培养基,用等量的乳糖、麦芽糖、葡萄糖、甘露糖和可溶性淀粉分别替代基础培养基中的蔗糖作为碳源,进行配制不同碳源的培养基。用打孔器打取直径5 mm菌丝块接种于不同碳源的培养基上(直径9 cm),置于25℃中进行培养,每个处理重复5次。培养7 d后用十字交叉法测量菌落直径。

④不同氮源对菌丝生长的影响:以Czapek培养基(2.00 g KNO₃、1.00 g KH₂PO₄、0.5 g KCl、

0.5 g MgSO₄·7H₂O、0.01 g FeSO₄、30.0 g 蔗糖、1 000 g 蒸馏水)为基础培养基,用等量的NaNO₃、Ca(NO₃)₂、谷氨酸、酵母膏、尿素、蛋白胨分别替代基础培养基中的KNO₃作为氮源,进行配制不同氮源的培养基。用打孔器打取直径5 mm菌丝块接种于不同氮源的培养基上(直径9 cm),置于25℃中进行培养,每个处理重复5次。培养7 d后用十字交叉法测量菌落直径。

⑤不同光照条件对菌丝生长的影响:在生长良好的菌落边缘用直径5 mm的打孔器打取菌丝块,接种于PDA培养基上(直径9 cm),置于全程黑暗处理、全程光照处理和光暗交替(12 h光照:12 h黑暗)三个光照环境中进行培养,每个处理重复5次。培养7 d后用十字交叉法测量菌落直径。

1.2.5 数据统计分析 用Excel统计软件计算菌丝生长抑制率,采用SPSS19.0软件进行计算各重复处理之间的方差值和不同处理之间的显著性检验。

2 结果与分析

2.1 海滨雀稗弯孢霉叶斑病危害症状

通过连续调查发现,该病害主要危害海滨雀稗叶片,发病严重时可危害茎基部(见图1)。发病初期叶病部出现大小不等的灰褐色水渍状病斑,病斑呈梭形或椭圆形,在病健交界处常形成红褐色边缘。发病严重时,整个发病叶片变黄皱缩,草坪出现不同程度枯死,导致衰弱、稀疏,最终出现不规则形枯草斑。后期病斑面积不断扩展,数个病斑汇合后引起海滨雀稗叶片大面积失绿、黄化,最后成片枯死(见图1A)。在湿度比较大的环境下,发病枯死的植株表明会产生大量灰褐色的霉状物,即形成的分生孢子梗和分生孢子(见图1C、D)。病斑继续扩展的植株表面在有露水清晨可见大量灰白色丝状菌丝体(见图1E)^[19-20]。

2.2 海滨雀稗弯孢霉叶斑病病原鉴定

将分离纯化后的病原菌采用温室盆栽苗菌饼接种方式进行致病性测定,结果表明(见图2),所分离得到的病原菌经过对海滨雀稗接种后所产生的症状与田间症状一致,接种4~5 d后可看到接种病原菌部位开始出现水渍状的退绿斑,连续观察10 d后,接种叶片出现枯黄变褐,且对显症部位进行取样再分离后所得病原菌与接种菌株一致。用不带菌的培养基进行接种后除表现出机械损伤外,接种部位无明显扩展症状。

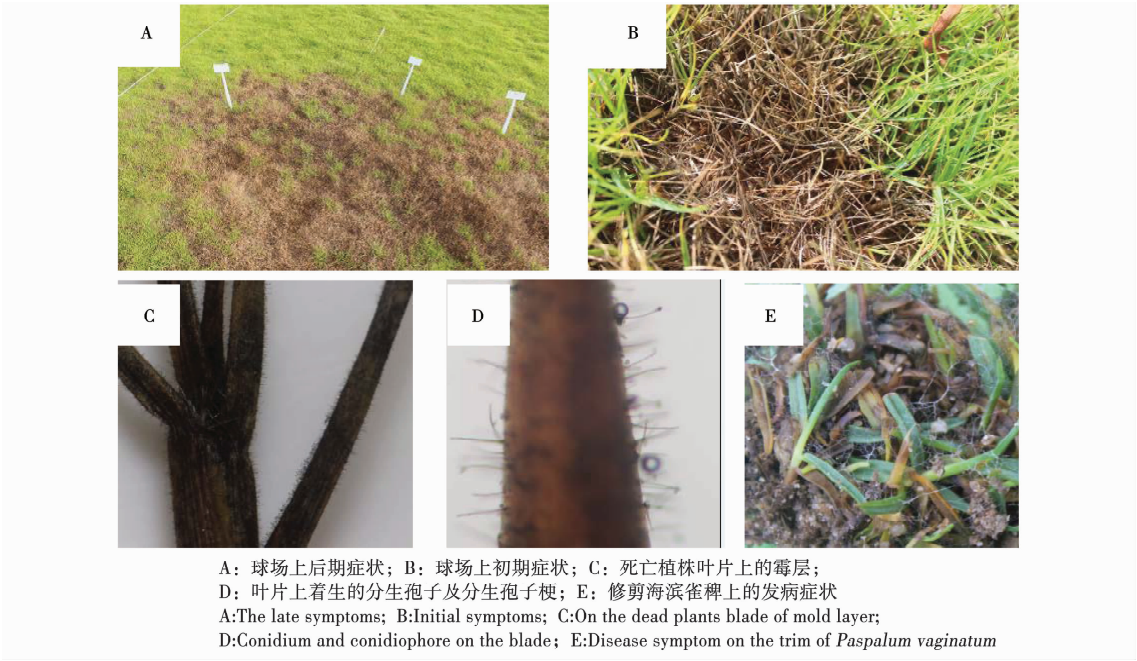


图 1 海滨雀稗弯孢霉叶斑病症状

Fig. 1 Symptoms of *Curvularia* Leaf Spot on *Paspalum vaginatum*

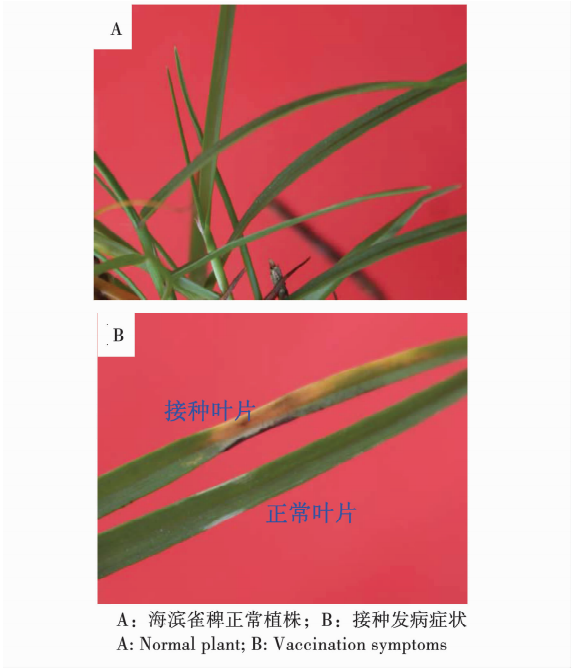


图 2 海滨雀稗弯孢霉叶斑病原菌致病性测定
Fig. 2 Pathogenicity identification of *Curvularia* Leaf Spot pathogenic bacteria on *Paspalum vaginatum*

2.3 海滨雀稗弯孢霉叶斑病原鉴定

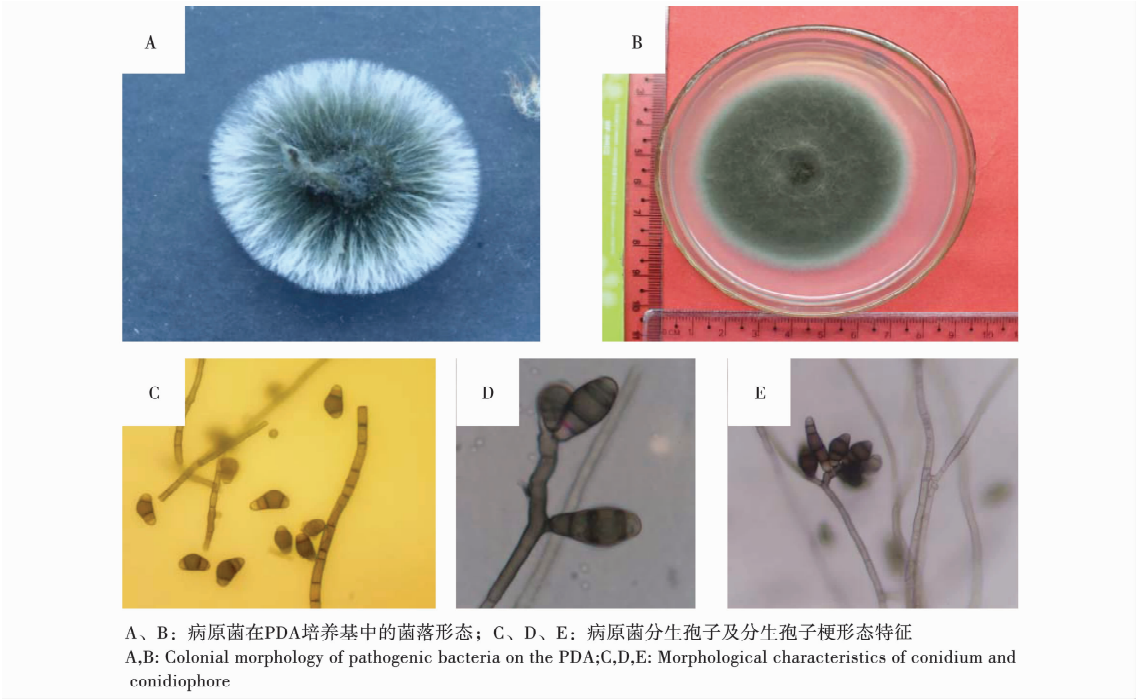
纯化后病原菌在 PDA 培养基上连续培养 5 d 后,菌落呈辐射状向四周平展生长,边缘规则,绒毛状,菌落培养初期颜色较浅,呈白色或灰白色(见图 3 A),后期逐渐变为褐色(见图 3B),菌

丝为有隔菌丝,有分枝现象,且在分枝处有稍缢缩情况(见图 3C)。分生孢子梗直径 4~6 μm ,常具多个隔膜,少见分枝,褐色,有时在顶端呈曲膝状弯曲(见图 3D),成熟分生孢子褐色至暗褐色,椭圆形或长椭圆形,平均大小 9.26 μm ×25.53 μm ,孢子具 3~4 个隔膜,两端大小不均匀,中间两细胞较大、颜色深,两端细胞小、颜色较浅,近于无色(见图 3C);分生孢子以点聚生方式着生于分生孢子梗上(见图 3D、E)。

通过对分生孢子梗和分生孢子进行形态特征描述,结合查阅《中国真菌志》(第 30 卷)蠕形分生孢子真菌中的弯孢属及所发表的其它相关弯孢属不同种分类方面的文献资料初步确认,引起海滨雀稗弯孢霉叶斑病的致病菌为:半知菌类(Fungi Imperfecti)从梗孢目(Moniliales)暗梗孢科(Dematiaceae)多孢亚科(Phragmosporoideae)弯孢霉属(*Curvularia* Boedijn)的新月弯孢霉[*Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn]。

2.4 不同温度对病原菌菌丝生长的影响

由表 1 结果可知,病原菌菌丝在 10~40℃不同温度条件下均可生长,且适宜生长温度为 25~35℃,最适生长温度为 30℃,连续培养 7 d 后,菌落直径为 70.26 mm,菌丝生长速率为 10.04 mm·d⁻¹。



A、B：病原菌在PDA培养基中的菌落形态；C、D、E：病原菌分生孢子及分生孢子梗形态特征
A,B: Colonial morphology of pathogenic bacteria on the PDA;C,D,E: Morphological characteristics of conidium and conidiophore

图 3 海滨雀稗弯孢霉叶斑病原菌形态特征

Fig. 3 Morphological characteristics of *Curvularia* Leaf Spot pathogenic bacteria on *Paspalum vaginatum*

表 1 不同温度环境对海滨雀稗弯孢霉叶斑病原菌菌丝生长的影响

Table 1 Effect of different temperatures on mycelium growth of *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn

处理温度/℃ Temperature	菌落直径/mm Diameter of colony	菌落生长速率/ (mm•d ⁻¹) Growth velocity	处理温度/℃ Temperature	菌落直径/mm Diameter of colony	菌落生长速率/ (mm•d ⁻¹) Growth velocity
10	5.47±0.39	(0.78±0.06) fE	30	70.26±5.61	(10.04±0.80) aA
15	21.92±1.14	(3.13±0.16) eD	35	63.31±5.30	(9.04±0.76) bA
20	35.02±6.80	(5.00±0.97) dC	40	7.49±0.66	(1.07±0.09) fE
25	53.33±4.68	(7.62±0.67) cB	-	-	-

表中数字后不同大小写字母表示差异显著性($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。下同。
Different capital letters and lowercases following the data indicate the significant difference at 0.01 and 0.05 level(Duncan’s multiple range test). The same below.

2.5 不同 pH 对病原菌菌丝生长的影响

由表 2 结果可知,病原菌菌丝在 pH 为 2.0~12.0 的不同酸碱环境条件下均可生长,但 pH 在

6~11 时生长比较良好,总体来说,在偏酸性条件下生长比较缓慢,微碱性条件下有利于菌丝生长。

表 2 不同 pH 环境对海滨雀稗弯孢霉叶斑病原菌菌丝生长的影响

Table 2 Effect of different pH on mycelium growth of *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn

处理温度/℃ Temperature	菌落直径/mm Diameter of colony	菌落生长速率/ (mm•d ⁻¹) Growth velocity	处理温度/℃ Temperature	菌落直径/mm Diameter of colony	菌落生长速率/ (mm•d ⁻¹) Growth velocity
2.0	6.72±0.40	(0.96±0.06) fE	8.0	60.14±5.10	(8.59±0.73) aA
3.0	24.86±1.66	(3.55±0.24) eD	9.0	59.37±1.93	(8.48±0.28) aA
4.0	26.65±3.77	(3.81±0.54) eD	10.0	58.46±1.11	(8.35±0.16) abA
5.0	39.86±2.37	(5.69±0.34) dC	11.0	55.32±2.89	(7.90±0.41) bAB
6.0	50.44±4.46	(7.21±0.64) cB	12.0	39.33±2.42	(5.62±0.35) dC
7.0	60.47±4.28	(8.64±0.61) aA	-	-	-

2.6 不同碳源、氮源对病原菌菌丝生长的影响

由表 3 可知,所选择的 5 种碳源以麦芽糖比较适合菌丝的生长,其生长速率为 9.95 mm·d⁻¹,其次是可溶性淀粉,相比较葡萄糖的生长最慢;在

不同氮源中,以蛋白胨作为氮源比较适合病原菌菌丝的生长,连续培养 7 d 后,其菌落直径为 72.51 mm,其次为硝酸钙,以谷氨酸作为氮源的生长最缓慢。

表 3 不同碳源和氮源对海滨雀稗弯孢霉叶斑病原菌菌丝生长的影响

Table 3 Effect of C source and N source on mycelium growth of <i>C. lunata</i> (Wakker) Boedijn					
不同碳源 C source	菌落直径/mm Diameter of colony	菌落生长速率/ (mm·d ⁻¹) Growth velocity	不同氮源 N source	菌落直径/mm Diameter of colony	菌落生长速率/ (mm·d ⁻¹) Growth velocity
麦芽糖 Maltose	69.64±3.44	(9.95±0.49) aA	蛋白胨 Peptone	72.51±0.56	(10.36±0.08) aA
可溶性淀粉 Soluble starch	65.99±1.69	(9.43±0.27) abAB	硝酸钙 Calcium nitrate	57.76±6.89	(8.25±0.98) bB
甘露醇 Mannitol	60.24±2.58	(8.61±0.37) bcBC	硝酸钠 Sodium nitrate	50.70±7.35	(7.24±1.05) bcB
乳糖 Lactose	56.82±7.57	(8.12±1.08) cC	尿素 Carbamide	36.67±8.30	(5.24±1.19) cB
葡萄糖 Glucose	56.06±2.33	(8.01±0.33) cCD	谷氨酸 Glutamic acid	28.76±3.24	(4.11±0.46) dC
Czapek 培养基 Czapek medium	48.31±4.60	(6.90±0.66) dD	Czapek 培养基 Czapek medium	48.31±4.60	(6.90±0.66) eC

2.7 不同光照环境对病原菌菌丝生长的影响

通过连续培养 7 d 后,发现不同光照对病原菌菌丝的生长无明显差异,无论在连续黑暗、光暗

交替还是在连续光照等情况,其菌丝菌落直径和菌落生长速率基本一致(见图 4)。

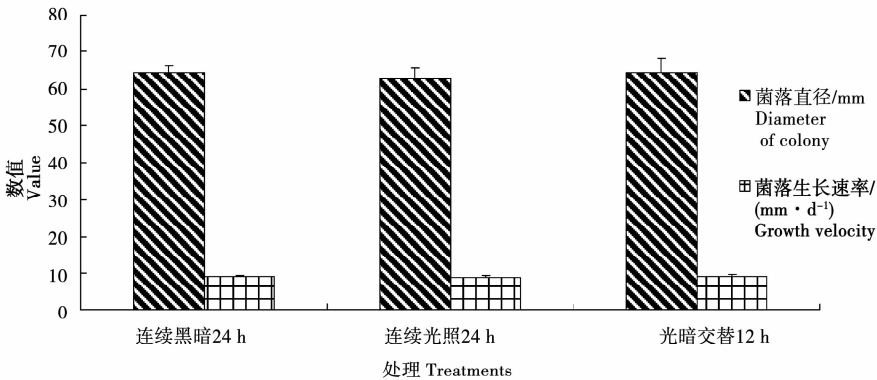


图 4 不同光照环境对弯孢霉叶斑病原菌菌丝生长的影响
Fig. 4 Effect of different lighting conditions on mycelium growth of *C. lunata* (Wakker) Boedijn

3 结论与讨论

通过对海滨雀稗弯孢霉叶斑病病原进行一系列纯化、接种试验,结合病原菌形态特征、培养性状并查阅有关研究资料后,初步确认引起海滨雀稗弯孢霉叶斑病的病原为半知菌亚门弯孢霉属的新月弯孢霉[*Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn]。新月弯孢霉是一种十分常见植物病原菌,分布极广,多存在于土壤和腐生植物体中,其致病范围较广,经研究报道,该病原可侵染水稻、高粱、玉米、番茄、辣椒、香蕉、唐菖蒲等多种作物及花卉,造成植物叶片枯萎或全株死亡^[15],除引起植物病害之外,新月弯孢霉还可引起真菌性角膜炎、足菌

肿、鼻中膈混合性侵袭性感染、鼻窦炎和应变性支气管肺泡病等^[24]。通过对该菌的主要生物学特性进行研究后,初步明确了该病菌的最适生长温度为 30℃,适宜生长 pH 为 7~9,最适碳源为麦芽糖,最适氮源为蛋白胨,但不同光照对菌丝生长基本无明显差异。由于受试验时间和条件所限,有关不同条件下对该菌的产孢量、孢子萌发情况的菌丝生长规律等未进行系统研究,尤其利用其生物学特性进行相关防治方面的研究还需进一步加强。

参考文献:

[1] 贺小霞,刘一明,王兆龙. 海滨雀稗栽培品种的形态特征与

- AFLP 分子标记分析[J]. 草地学报, 2011, 19(1): 164.
- [2] 罗小波, 向佐湘, 胡立群. 09-1 海滨雀稗草坪坪用性状评价[J]. 作物研究, 2013, 27(S01): 57-61.
- [3] 张兆松. 海滨雀稗, 一种极具潜力的应用草种[J]. 世界高尔夫, 2011(10): 91-91.
- [4] 王淑娥, 杨泽秀. 栽培基质, 修剪和践踏对海滨雀稗草生长特性的影响[J]. 安徽农业科学, 2010(29): 16460-16463.
- [5] 王恺. 适用于海滨雀稗草坪杂草防除的除草剂[J]. 草原与草坪, 2013, 33(5): 86-89.
- [6] 刘湘林, 陈跃进, 徐庆国, 等. 草坪草海滨雀稗的抗寒机理研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(16): 9539-9541.
- [7] 邹轶, 顾洪如, 钟小仙, 等. 海盐胁迫对海滨雀稗生长及植株体内阳离子含量的影响[J]. 草业科学, 2009, 26(4): 117-120.
- [8] 钟小仙, 邹轶, 张建丽, 等. 海盐胁迫对海滨雀稗植株形态与生长的影响[J]. 江苏农业科学, 2009(6): 235-236.
- [9] 陈龙兴. 浅谈草坪草海滨雀稗的管理与养护[J]. 上海农业科技, 2007(4): 102-103.
- [10] 张兆松. 海滨雀稗草坪上叶斑病的发生与防治[J]. 世界高尔夫, 2012(8): 170-170.
- [11] 吕晨辰, 罗来鑫, Hsiang Tom, 等. 我国海滨雀稗叶斑病原菌鉴定及生物学特性研究[C] //中国植物病理学会. 中国植物病理学会学术年会 2010 年论文集, 北京: 中国农业科学技术出版社, 2010.
- [12] 章武, 刘国道, 南志标. 4 种暖季型草坪草叶斑病原菌鉴定及其生物学特性[J]. 草业学报, 2015, 24(1): 124-131.
- [13] 李昆. 海滨雀稗病虫害防治要点[N]. 中国花卉报, 2013-06-27(S08).
- [14] 李晓宇, 石洁. 几种玉米弯孢霉叶斑病菌生物学特性的比较[J]. 河北农业大学学报, 2002, 25(3): 61-64.
- [15] 郑楠, 赵敏. 真菌新月弯孢霉的研究进展[J]. 黑龙江医药, 2010, 23(2): 165-167.
- [16] 张猛, 谢桂英, 刘建华. 禾本科植物上的弯孢属真菌[J]. 河南农业科学, 2007(11): 58-60.
- [17] 吴文平. 河北省丝孢菌的研究 II、弯孢属[J]. 河北省科学院学报, 1990(2): 66-73.
- [18] 王昌亮. 弯孢属种分子鉴定体系的建立及其在疑难种上的应用[D]. 郑州: 河南农业大学, 2011.
- [19] 万中达. 植物研究方法[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2007: 110-156.
- [20] 张天宇. 中国真菌志第 30 卷蠕形分生孢子真菌[M]. 北京: 科学出版社, 2010: 109-165.
- [21] 何秋, 刘建秀. 草坪草真菌病害的研究进展[J]. 草业科学, 2006, 23(4): 95-104.
- [22] 李海霞. 草坪弯孢霉叶斑病原菌生物学特性及化学防治措施的研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2002.
- [23] 贾凤姣. 狗牙根弯孢霉叶斑病的病原学研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2007.
- [24] 王露霞, 石凌波, 张磊, 等. 新月弯孢霉致角膜溃疡 1 例[J]. 中国真菌学杂志, 2014, 9(4): 231-234.

Identification and Biological Characteristics of *Curvularia* Leaf Spot on *Paspalum vaginatum*

LIN Jiang, WANG Hong-xing, ZHAO Qing-jie, ZHANG Yi-heng

(College of Applied Science and Technology, Hainan University Danzhou Campus, Danzhou, Hainan 571737)

Abstract: The *Curvularia* leaf spot is one of the important diseases in golf courses maintenance management. In order to effectively clear the basic characteristics of the disease pathogen, species identification, the pathogenic determination and the biological characteristics of the *Curvularia* leaf spot on *Paspalum vaginatum* were researched. The results showed that the *Curvularia* leaf spot on *Paspalum vaginatum* pathogens belonged to *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn. Pathogenic bacteria of which the mycelium's optimum temperature for growth was 30℃ and pH was 7. Different illumination had no effect on the growth of the mycelium. Using maltose as the carbon source and peptone as the nitrogen source were more suitable for the growth of the mycelium.

Keywords: *Paspalum vaginatum*; *Curvularia* Boedijn; biological characteristics

致 读 者

为适应我国信息化建设,扩大本刊及作者知识信息交流渠道,本刊现被《中国学术期刊网 络出版总库》及 CNKI 等系列数据库收录,其作者文章著作权使用费与本刊稿酬一次性给付。如作者不同意文章被收录,请在来稿时声明,本刊将做适当处理。

《黑龙江农业科学》编辑部