

DOI:10.11937/bfyy.201711015

坪床结构对结缕草根部分入侵真菌的影响

刘天增^{1,2}, 李佳岭^{1,2}, 张巨明^{1,2}

(1. 华南农业大学 林学与风景园林学院, 广东 广州 510642; 2. 华南农业大学 草业工程研究中心, 广东 广州 510642)

摘要:以‘兰引Ⅲ号’结缕草(*Zoysia japonica* cv. ‘Lanyin No. Ⅲ’)为试材,研究了在5种不同坪床结构(P:85%砂+15%泥炭;Z:85%砂+15%沸石;M:85%砂+7.5%泥炭+7.5%沸石;T5:100%砂+保水剂,保水剂铺设在表层下5 cm处,T10:100%砂+保水剂,保水剂铺设在表层下10 cm处)下,‘兰引Ⅲ号’结缕草根部分入侵真菌的带菌率,并且利用形态学及分子学方法鉴定根部分入侵真菌种类。结果表明:Z和M坪床结构处理的结缕草根段带菌率显著高于T10、T5、P处理($P<0.05$)。从结缕草的根段中共分离培养得到入侵真菌12属14种,其中M坪床根段共带菌9属11种,P坪床根段共带菌7属8种,Z坪床根段共带菌8属9种,T10坪床根段共带菌7属8种,T5坪床根段共带菌6属7种。丝核菌(*Rhizoctonia* sp.)和尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)的分离率较高,在5种坪床结构处理中均能分离得到,而且是能引起草坪病害的潜在病原真菌。沸石会明显增加‘兰引Ⅲ号’结缕草根部的带菌率,在以后草坪建植时需考虑减少对沸石的使用。

关键词:结缕草;入侵真菌;带菌率;病害

中图分类号:S 688.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)11-0066-05

根部入侵真菌是指已经侵入寄主植物根部,经表面消毒又不能将其杀死,肉眼观察不到症状的一类真菌。不同于土壤真菌,根部入侵真菌吸收植物根系分泌物或营腐生生活,分解植物残体,在自然界物质循环中起重要作用^[1]。入侵真菌是一大类未被充分认识的真菌,在整个真菌学发展史上,入侵真菌的研究历史并不长。1924年,LEWIS首次报道禾本科植物叶片中存在有入侵真菌,但此后的研究工作很少,直到近20年,对于植物入侵真菌的研究才逐渐趋于活跃。入侵真菌种类繁多,它们在寄主植物组织内部生长发育过程中,其代谢产物不仅对植物体本身有着各种各样的影响,而且对其它生物也有不同的作用。入侵真菌在植物组织内有足够的碳、氮源,而且受到植物组织的良好保护,因而比暴露于恶劣环境的附生菌和腐生菌具有更稳定的生存环境,

更易于发挥作用^[2]。近年来,植物入侵真菌引起了植病学家、微生物学家、生态学家的广泛重视,成为国内外研究的又一热点。

以往对草类作物的根部入侵真菌研究大多集中在牧草上,如苜蓿^[3]、沙打旺^[4]、三叶草^[5]等。关于草坪草的入侵真菌国内外研究较少,张成霞等^[6]用黑麦草、高羊茅和草地早熟禾为试材,以田间土壤为培养基质,自种子和幼苗上共分离得到14种入侵真菌。随着草坪新兴产业的大力发展,草坪草种植面积不断扩大,国内外大量品种引进必然带来许多病害,草坪草根部分入侵病害已逐渐成为草坪业的主要限制因素,因此进行真菌病害的研究是十分必要的。借鉴在牧草上对病原真菌的取样分离方法,根部病害的真菌种类的研究、病原真菌的致病性以及测定方法、影响根部入侵真菌的因素的研究,有利于指导草坪草病害上的研究工作。因此,对草坪草广泛开展入侵真菌的区系研究,明确各地导致真菌病害尤其是根部真菌病害的病原真菌种类、侵染特点、发生规律以及致病机制等,有针对性地为病害防治工作奠定基础。

第一作者简介:刘天增(1984-),男,博士,讲师,研究方向为草地病理生态。E-mail:liutianzeng@scau.edu.cn.

责任作者:张巨明(1963-),男,博士,副研究员,研究方向为草坪与草地生态。E-mail:jimmzh@scau.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31502011);广东省科技计划资助项目(2012B020302002)。

收稿日期:2017-03-14

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试‘兰引Ⅲ号’结缕草草皮取自华南农业大学增城教学科研基地,长势良好,整齐一致,无病虫害和杂草,剪草高度 4 cm。砂和砾石来源于广州岑村一家砂石场,粒径经分析符合 USGA 标准。泥炭为德国产 Klamann 泥炭,沸石来源于广州广希顺矿产品有限公司,粒径 0.05~0.15 mm 部分占 96.31%。保水构件由华南农业大学资源环境学院新肥料资源研究中心研制,由 80%的保水剂和 20%的磷矿粉制成,为粉剂。肥料包括复合肥(15%N-15%P₂O₅-15%K₂O)、尿素(含 N 46%)和硫酸钾(含 K₂O 60%)。

1.2 试验方法

1.2.1 坪床结构 试验共设计 5 种坪床结构,分别为 85%砂+15%泥炭(USGA 结构,有机改良,用 P 表示)、85%砂+15%沸石(USGA 结构,无机改良,用 Z 表示)、85%砂+7.5%泥炭+7.5%沸石(USGA 结构,有机无机混合改良,用 M 表示)、100%砂+保水构件浅埋(USGA 结构,保水构件埋设在表层下 5 cm 处,用量 5 g·m⁻²,用 T5 表示)、100%砂+保水构件深埋(USGA 结构,保水构件埋设在表层下 10 cm 处,用量 5 g·m⁻²,用 T10 表示)。坪床混合材料厚度 30 cm,其下铺 10 cm 碎石(粒径 0.6~1.0 cm),两层之间用孔径为 1 mm 尼龙网隔离,箱底十字交叉开孔,中心 1 孔,纵横各 2 孔,共开 5 孔,孔径 0.5 cm,孔间间隔 10 cm。箱底也铺设孔径 1 mm 的尼龙网(图 1)。种植盆为长方形 PVC 箱,规格 50 cm(长)×40 cm(宽)×40 cm(高),每种结构重复 3 盆,共 15 盆。所有处理水肥管理一致,5 d 浇一次水,每盆一次 1 L,每 30 d 施复合肥一次,每盆 3 g。

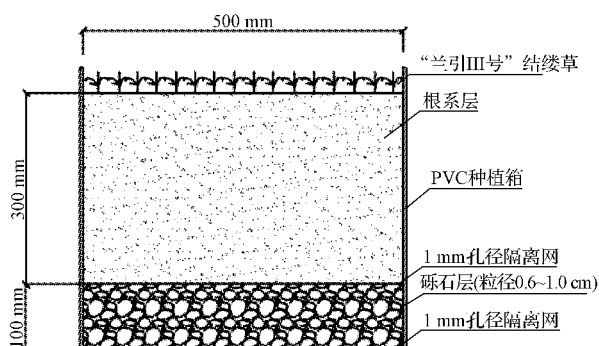


图 1 ‘兰引Ⅲ号’结缕草种植盆结构

Fig. 1 Structure of planting basin of *Zoysia japonica* cv. ‘Lanyin No. III’

1.2.2 真菌分离培养 分别采集 5 种不同坪床结构生长的‘兰引Ⅲ号’结缕草根样。将供试根样在自来水下冲洗干净,去除侧根,略刮去皮层。自中柱截取根段长 8 cm,酒精消毒 30 s,无菌水清洗,然后于 1% 次氯酸钠溶液中表面消毒 1 min,取出后无菌水冲洗 4~5 次,无菌滤纸吸干表面水分,切成厚约 4 mm 的根段,随机取 10 段均匀摆于含有庆大霉素 1 mL·L⁻¹的马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)上。5 皿为一重复,15 个处理(15 盆),共 75 皿。黑暗条件下 25 °C 恒温培养箱中培养,5 d 后统计各培养皿根段带菌率和真菌分离率情况,并对分离所获真菌进行纯化培养。根段带菌率(%)=每培养皿的带菌根段数/每培养皿的总根段数×100;真菌的分离率(%)=一种真菌在每皿出现的次数之和/每培养皿的总根段数×100。

1.2.3 真菌的形态学鉴定 对于培养的真菌菌落,详细观察记载其菌落大小,将病原菌于 PDA 平板上培养,观察菌落形态;另外挑菌丝于载玻片上,用显微镜观察,对菌株的形态进行描述和测量,包括分生孢子梗和产孢细胞的形态和大小;分生孢子的形态、隔膜数及大小;子囊壳、子囊及子囊孢子的形态和大小等。参考《真菌鉴定手册》将真菌鉴定到属,个别真菌鉴定到种。

1.2.4 真菌的分子鉴定 将纯化后的真菌在马铃薯葡萄糖液体培养基中培养,25 °C、180 r·min⁻¹振荡培养 4 d,抽空过滤收集菌丝体,-20 °C 保存备用。利用 OMEGA Fungal DNA Extraction 试剂盒提取真菌 DNA。然后,用通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAG-GTGAACCTGCGG-3')和 ITS4 (5'-TCCTCCGCT-TATTGATATGC-3')对分离菌株进行 PCR 扩增。扩增条件为:95 °C 预热 3 min;95 °C 变性 1 min,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 60 s,共 35 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,并委托上海生工生物工程公司纯化和测序,将得到的序列提交 GenBank 数据库中进行比对。

1.3 数据分析

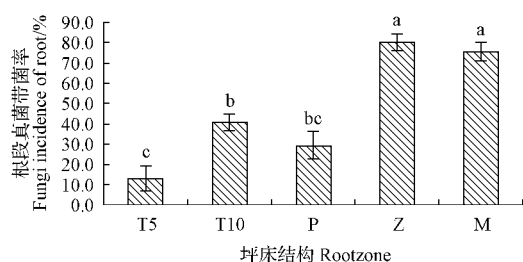
试验数据均以平均值表示,采用 Excel 软件进行数据图表分析,运用 SPSS 17.0 软件进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 ‘兰引Ⅲ号’根段带菌率

T5 坪床结构处理的‘兰引Ⅲ号’结缕草根段真菌带菌率最低,为 13.3%,Z 坪床结构处理的根段真菌带菌率最高,为 83.3%。混有沸石的 Z 和 M 坪床

结构处理的结缕草根段真菌带菌率显著高于 T10、T5 和 P 等坪床结构 ($P < 0.05$), 说明坪床中的沸石可能会增加结缕草根部的带菌率。T10 坪床结构处理的根段真菌带菌率显著高于 T5 坪床结构处理 ($P < 0.05$), 说明保水剂的施用深度也对根段带菌率有影响(图 2)。

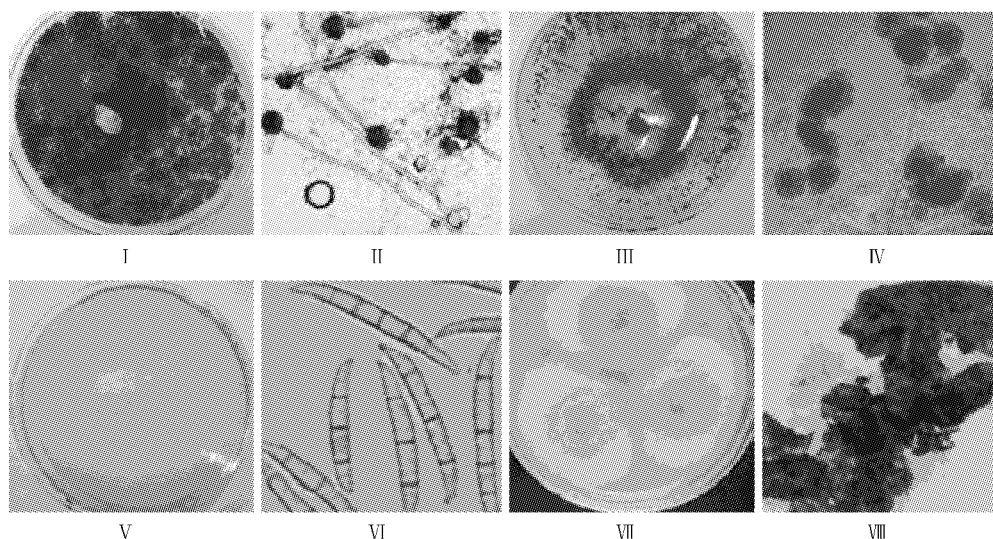


注:图中不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: Different lowercase letters indicate significant difference at 0.05 level.

图 2 不同坪床‘兰引Ⅲ号’根段真菌带菌率

Fig. 2 Fungi incidence of root under different rootzones



注: I和II, 黑曲霉的菌落和孢子形态; III和IV, 木霉的菌落和孢子形态; V和VI, 尖孢镰刀菌的菌落和孢子形态; VII和VIII, 小球壳孢菌的菌落和孢子形态。

Note: I and II, colony and spore of *Aspergillus*; III and IV, colony and spore *Trichoderma*; V and VI, colony and spore of *Fusarium*; VII and VIII, colony and spore of *Microsphaeropsis*.

图 3 部分入侵真菌的培养形状和孢子结构

Fig. 3 Cultural characteristics and spores of some root invading fungi

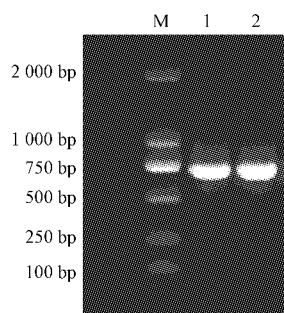
利用 OMEGA Fungal DNA Extraction 试剂盒提取法, 获得供试菌株的 DNA。将提取的 DNA 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。提取的菌株基因组 DNA 电泳条带清晰、明亮, 无弥散和降解现象。采用真菌 ITS 区域通用引物 ITS1 和 ITS4 对菌株的 ITS 序列进行扩增, 获得大小为 500~800 bp 的 DNA 片段

2.2 根部入侵真菌的鉴定

将病原菌于 PDA 平板上培养, 观察菌落形态; 另外挑菌丝于玻片上, 用显微镜观察后, 可以观测到真菌的菌丝以及孢子形态(图 3)。黑曲霉(*Aspergillus nige*)菌落黑褐色, 分生孢子头褐黑色放射状, 分生孢子梗长短不一, 顶囊球形。绿色木霉(*Trichoderma viride*)菌落生长迅速, 呈不定型棉絮状, 其表面的颜色呈绿色。在分枝末端形成瓶状小梗。分生孢子为卵圆形, 簇生于小梗顶端。尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)在 PDA 平板上培养, 菌落突起絮状, 菌落粉白色, 略带有紫色, 由于大量孢子生成而呈粉质。大型分生孢子镰刀形, 少许弯曲, 多数为 3 隔。小球壳孢菌(*Microsphaeropsis arundinis*)质地绒状, 较疏松, 中部凸起, 菌落起初灰色, 后期颜色变深, 深灰色至棕色, 边缘色浅, 无渗出液, 分生孢子器散乱分布在培养基中, 黑色, 形状不规则, 或生于叶片表面, 分生孢子生于分生孢子器内。

(图 4)。将测序后的病原菌 ITS 序列提交至 GenBank 数据库, 与已报道的 ITS 序列进行比对。结果表明, 利用 ITS 方法鉴定根部入侵真菌 12 属 14 种。其中镰刀菌属(*Fusarium*)2 种, 分别为尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)、层出镰刀菌(*F. proliferatum*); 青霉属(*Penicillium*)2 种, 分别为鲜红青霉

(*P. chermesinum*)、青霉(*Penicillium* sp.)、丝核菌属(*Rhizoctonia*)、曲霉属(*Aspergillus*)、弯孢属(*Curvularia*)、木霉属(*Trichoderma*)、小皮伞菌属(*Marasmius*)、子囊菌属(*Ascomycota*)、拟盾壳霉属(*Paraconiothyrium*)、小球壳孢属(*Microsphaeropsis*)、赤霉属(*Gibberella*)、黑孢霉属(*Nigrospora*)。分子鉴定结果与形态鉴定结果相一致。



注:M. Marker;1. 层出镰刀菌;2. 小球壳孢菌。

Note: M. Marker; 1. *Fusarium proliferatum*; 2. *Microsphaeropsis arundinis*.

图4 部分菌株 ITS 序列 PCR 电泳结果

Fig. 4 Electrophoresis result of some root invading fungi

2.3 不同坪床对根部入侵真菌种类的影响

从5种不同坪床处理的结缕草根段中共分离鉴定出12个属的入侵真菌,不同坪床结构下根部入侵真菌的种类不同,且同一种入侵真菌的分离率也不同。从表1可以看出,M、P和Z3个坪床处理的结缕草根段入侵真菌种类较多,而T10和T5坪床处理

表1 不同坪床结构结缕根段
入侵真菌分离率

Table 1 Percent frequency of root invading fungi
isolated under different rootzones %

真菌种类 Fungi species	坪床结构 Rootzone				
	M	P	Z	T10	T5
黑曲霉 <i>Aspergillus nige</i>	2.52a	0.37c	0.37c	0.74c	1.48b
丝核菌 <i>Rhizoctonia</i> sp.	4.78b	2.22c	11.54a	6.30b	1.48c
尖孢镰刀菌 <i>Fusarium oxysporum</i>	11.74a	5.93b	2.96bc	13.70a	1.11c
弯孢 <i>Curvularia boedin</i>	0.30b	—	—	1.85a	0.41b
绿色木霉 <i>Trichoderma viride</i>	—	—	—	2.59b	—
小皮伞菌 <i>Marasmius</i> sp.	1.40b	—	—	0.74b	—
鲜红青霉 <i>Penicillium chermesinum</i>	7.30a	2.59b	3.33b	—	0.74c
层出镰刀菌 <i>Fusarium proliferatum</i>	1.10c	8.56a	—	—	2.93b
子囊菌 <i>Ascomycota</i> sp.	—	1.85a	—	—	—
拟盾壳霉 <i>Paraconiothyrium cyclothyrioides</i>	—	—	2.56a	—	—
小球壳孢菌 <i>Microsphaeropsis arundinis</i>	0.74ab	1.85a	1.11ab	—	—
赤霉 <i>Gibberella thapsina</i>	10.22a	—	0.74b	—	—
黑孢霉 <i>Nigrospora</i> sp.	4.00b	0.74c	4.37b	18.70a	3.97b
青霉 <i>Penicillium</i> sp.	0.30b	—	2.22a	0.37b	—

的结缕草根段入侵真菌种类较少。M坪床结缕草根段入侵真菌9属11种,P坪床结缕草根段入侵真菌7属8种,Z坪床结缕草根段入侵真菌8属9种,T10坪床结缕草根段入侵真菌7属8种,T5坪床结缕草根段入侵真菌6属7种。在所有入侵真菌中,丝核菌、尖孢镰刀菌、黑曲霉和黑孢霉的分离率最高,而且在5种坪床结构处理中均能分离得到,说明此类真菌是结缕草根段入侵真菌中的主要种类。

3 结论与讨论

随着草坪利用年限的增加,病害的发生也呈现增加的趋势。草坪根部病害是由土传真菌侵染引起,病原菌种类及数量因土壤、生态条件而异。该试验首次研究了不同的坪床结构对‘兰引Ⅲ号’结缕草根段入侵真菌的影响。研究表明,T5坪床结构中的结缕草根段真菌带菌率最低,为13.3%,Z坪床结构处理的‘兰引Ⅲ号’结缕草根段真菌带菌率最高,为83.3%。这说明根段带菌率与坪床结构有直接关系,土壤区系的不同会造成土壤及植物根系中微生物种类的差别^[7]。保水剂是亲水性高分子聚合物,不溶于水,但能迅速吸收相当于自身质量几百倍至几千倍的水。若保水剂施用合理,能提高土壤肥力和土壤含水量,改善土壤结构,有利于促进作物的生长发育^[8]。与不施用保水剂相比,在施用保水剂的条件下微生物生物量更小,其原因为保水剂使得微生物与土壤颗粒紧密结合,或者微生物之间结合紧密,从而抑制了微生物的增长,减少了根部入侵真菌的种类和数量^[9]。

Z和M坪床处理基质中都含有沸石,说明添加沸石可能会明显增加草坪草根段的带菌率。以往的研究发现,坪床中砂与改良物质的不同构成比例会影响坪床结构的物理特性,其中坪床中添加沸石提高了毛管孔隙度,显著降低坪床的导水率^[10-11]。而且,加入沸石对土壤总体微生物的碳源代谢活性的促进作用不如泥炭和保水剂。在坪床中添加泥炭可有效地提高土壤微生物的活性、多样性及优势度,进而抑制或降低了某些病原真菌入侵草坪根系,减少根部病害发生^[12]。因此,从结缕草根段入侵真菌的带菌率考虑,在建造坪床时不推荐含有沸石的坪床结构。

据报道,大多数根部入侵真菌具有致病性,其中研究最多、致病性较强的是镰刀菌(*Fusarium* spp.)和丝核菌(*Rhizoctonia* spp.),其次是子囊菌(*Ascomycotia* spp.)^[13-14]。在草坪生产中,枯萎病是大多数草坪容易遭受的一种严重土传病害,通常是由尖孢镰刀菌寄生引起。病原菌从根部危害草坪,引起

维管束坏死,造成植株枯萎^[15]。丝核菌主要引起草坪褐斑病,该病在世界范围内的冷季型和暖季草坪中都有发生,其不仅造成草坪植株死亡,更严重的是造成草坪大面积斑秃,极大地破坏草坪景观。丝核菌分布广泛,可引起多种植物病害,在土壤中的腐生竞争力强,存活时间长,被认为是最具破坏力的土传植物病原物之一^[16]。

该研究从‘兰引Ⅲ号’结缕草根段中共分离、鉴定出 19 种真菌,其中黑曲霉、镰刀菌和丝核菌在所有坪床结构处理中均能分离得到。这些真菌在其它植物如苜蓿、小麦、沙打旺上均有报道,说明此类真菌分布的普遍性,在某些条件下可能会引起草坪根部病害,导致草退化,利用年限缩短。因此,在草坪建植与养护管理过程中必须加以重视,采取科学的管理措施,增强草坪对此类真菌的抗性^[17]。除了共同的根部入侵真菌外,还有几种真菌的分布表现出一定的特殊性,如子囊菌只在 P 坪床结构中出现,拟盾壳霉只在 Z 坪床结构中出现,绿色木霉只在 T10 坪床结构中出现。这可能与沙质坪床中添加的有机或无机改良物特性有关,也可能是泥炭、沸石或保水剂本身带有的真菌。

参考文献

- [1] 姚拓,马丽萍,张德盟.我国草地土壤微生物生态研究进展及浅评[J].草业科学,2005,22(11):5-11.
- [2] 李飞,李春杰.内生真菌对禾草类植物抗旱性的影响[J].草业科学,2006,23(3):57-62.
- [3] 郭玉霞,南志标,王成章,等.苜蓿根部入侵真菌研究进展[J].

草业学报,2009,4(5):243-249.

- [4] 尹亚丽,南志标,李春杰,等.沙打旺根部入侵真菌的研究[J].草原与草坪,2006(1):45-48.
- [5] SKIPP R A, CHRISTENSEN M J, NAN Z B. Invasion of red clover (*Trifolium pratense*) roots by soil borne fungi[J]. New Zealand Journal of Agricultural Research, 1986, 29: 305-313.
- [6] 张成霞,南志标,李春杰,等.杀菌剂拌种防治草坪草病害的研究进展[J].草业学报,2005,14(6):14-22.
- [7] 周启武.疯草内生真菌多样性及检测方法研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2013.
- [8] 马行,刘刊,权俊娇,等.高温胁迫下保水剂对黑麦草光合特性的影响[J].北方园艺,2013(21):77-81.
- [9] SOJKA R E, JAMES A E, JEFFY J F. The influence of high application rates of polyacrylamide on microbial metabolic potential in an agricultural soil[J]. Applied Soil Ecology, 2006(32): 243-252.
- [10] 徐德福,徐建明,李映雪.几种人工湿地基质微生物活性研究[J].农业环境科学学报,2008,27(2):753-757.
- [11] 任岩岩,武继承.保水剂对土壤性质及土壤微生物的影响研究进展[J].河南农业科学,2009(4):13-15.
- [12] 王小琼,舒常庆,王洪顺,等.不同基质对新建果岭土壤微生物,酶活性及草坪性状的影响[J].草地学报,2013(2):338-345.
- [13] 郭玉霞,严学兵,王成章,等.豫中平原区紫花苜蓿根部入侵病原真菌的种类及其分布特征[J].草业科学,2011,28(10):1755-1765.
- [14] 郭玉霞,南志标,李春杰,等.黄土高原区苜蓿与小麦轮作系统根部入侵真菌研究[J].生态学报,2004,24(3):486-494.
- [15] 高晓敏,王据钢,马立国,等.尖孢镰刀菌致病机理和化感作用研究进展[J].微生物学通报,2014,41(10):2143-2148.
- [16] 殷萍萍,李珊珊,王玉玲,等.立枯丝核菌对日本结缕草的侵染过程研究[J].微生物学通报,2015,42(7):1253-1262.
- [17] 王肇庆,尹淑霞.施肥量与修剪高度对草地早熟禾褐斑病的影响[J].草地学报,2014,22(5):1103-1109.

Effects of Rootzone Composition on Root-invading Fungi From *Zoysiagrass*

LIU Tianzeng^{1,2}, LI Jialing^{1,2}, ZHANG Juming^{1,2}

(1. College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642; 2. Engineering Research Center for Grassland Science, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642)

Abstract: *Zoysia japonica* cv. ‘Lanyin No. III’ was used as material, five different rootzone compositions were designed, namely P, 85% sand + 15% peat; Z, 85% sand + 15% zeolite; M, 85% sand + 7.5% zeolite + 7.5% peat; T5, absorbent polymers component laid at a depth of 5 cm; T10, absorbent polymers component laid at a depth of 5 cm respectively to study effects of rootzone composition on root-invading fungi incidence. Morphological and molecular methods were used to identify the fungal isolates. The results showed that 14 fungal species were isolated and identified from the root. *Rhizoctonia* sp. and *Fusarium oxysporum* were the most common fungal species in all rootzone composition, and were the potential pathogenic fungi that might cause turf diseases. Root-invading fungi and their incidence showed a significant difference under rootzones. The lower incidence of fungi were found in T5 and T10, and the higher incidence of fungi were found in M and Z. The rootzone mixed with zeolite significantly increase root-invading fungi incidence and species of *Zoysiagrass*. The above founding could suggest that it was necessary to consider reducing the use of zeolite in turf establishment.

Keywords: *Zoysiagrass*; root-invading fungi; incidence; disease