

Phaeosphaeria sp. HD-06 菌株对马唐的致病性分析及初步鉴定

邹德勇^{1,2}, 杨智越³, 杜春梅^{1,2*}

(1. 黑龙江大学农业微生物技术教育部工程研究中心, 哈尔滨 150500; 2. 黑龙江大学生命科学学院, 黑龙江省普通高校微生物重点实验室, 哈尔滨 150080; 3. 哈尔滨兴普饲料有限公司, 哈尔滨 150010)

摘要 为了得到能够有效抑制马唐 *Digitaria sanguinalis* 生长的生防微生物, 在农田采集马唐种子, 进行萌发试验, 观察种子的萌发状况, 从发病的种子和马唐幼苗基部分离致病菌, 通过形态学观察以及 ITS 序列分析对致病菌进行鉴定。结果从罹病的马唐幼苗基部分离得到一株致病菌 HD-06, 该菌株的发酵液用水稀释至 60% 浓度时, 对马唐种子的萌发抑制率和幼苗发病率均达到 100%, 这说明菌株 HD-06 对马唐有较好的生物防治作用。根据其形态学特点及 ITS 序列分析结果, 鉴定菌株 HD-06 为暗球腔菌属 *Phaeosphaeria* 的真菌。这些结果为深入研究其对马唐的防治作用奠定了基础。

关键词 马唐; 生防菌; 致病性; 鉴定

中图分类号: S 476 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2019166

Pathogenicity of *Phaeosphaeria* sp. HD-06 against *Digitaria sanguinalis* and the preliminary identification of the strain

ZOU Deyong^{1,2}, YANG Zhiyue³, DU Chunmei^{1,2*}

(1. Engineering Research Center of Agricultural Microbiology Technology, Ministry of Education, Heilongjiang University, Harbin 150500, China; 2. Key Laboratory of Microbiology, College of Heilongjiang Province, School of Life Sciences, Heilongjiang University, Harbin 150080, China; 3. Harbin Xingpu Feed Company, Harbin 150010, China)

Abstract In order to obtain the effective biocontrol microorganism for inhibiting the growth of *Digitaria sanguinalis*, the seeds of crabgrass were collected in the farmland, and seed germination test was carried out. The germinating situation was tracked over time; meanwhile, the pathogens were isolated from the diseased seeds and the seedling base, and morphological observation and ITS sequence analysis were conducted to identify the pathogenic fungi. The results showed that a disease-causing strain named HD-06 was successfully isolated from diseased crabgrass seedling base. When the fermentation broth of strain HD-06 was diluted by 60% with water, the germination inhibition rate and seedling disease incidence rate of crabgrass reached 100% after treatment. It indicated that strain HD-06 had a good biological control effect on crabgrass. According to the morphological characteristics and ITS sequence analysis results, strain HD-06 was identified as a fungus of the genus *Phaeosphaeria*. These results laid a foundation for further research on its control effect on crabgrass.

Key words *Digitaria sanguinalis*; biocontrol bacteria; pathogenicity; identification

马唐 *Digitaria sanguinalis* 是禾本科单子叶植物, 是一种秋熟作物农田中的杂草, 在热带和温带地区的 36 个国家均有分布, 对 30 多种农作物的生产有严重危害^[1]。由于马唐具有极强的抗逆能力和营养竞争力, 能够在水、旱等多种类型的连作农田中快

速蔓延, 极难防除, 被列为 18 种恶性杂草之一^[2]。化学农药的长期施用导致马唐已经对草甘膦^[3-4]、氟磺草胺、噁唑酰草胺、精噁唑禾草灵、烟嘧磺隆^[5-6]等多种除草剂产生了抗药性。而一些化学除草剂具有的潜在致癌致畸毒性也导致人们对其应用产生了一

收稿日期: 2019-04-03

修订日期: 2019-06-03

基金项目: 国家自然科学基金(31370511); 国家重点研发计划(2017YFD0201101)

* 通信作者 E-mail: 1487598102@qq.com

定的抵触心理。而生物除草剂具有无毒、无害、无污染、生物安全性高,且不易产生抗药性等优点,成为化学农药的良好替代品,引起人们的广泛关注。

目前国内外可用于防除杂草的真菌主要有 10 属 8 种^[7],其中柄锈菌属 *Puccinia* sp.、镰刀菌属 *Fusarium* sp.、尾孢属 *Cercospora* sp.、链格孢属 *Alternaria* sp. 等的种类较多,目前在生产中应用的真菌除草剂主要有 Collegeo(主要成分为盘长孢状刺盘孢 *Colletotrichum gloeosporioides*)、Devine(主要成分为棕榈疫霉 *Phytophthora palmivora* 的厚垣孢子悬液)、鲁保一号(主要成分为胶孢炭疽菌菟丝子专化型 *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. f. sp. *cuscutae*)和 Biochon(主要成分为银叶菌 *Chondrostereum purpureum*)以及敌散克(主要成分为画眉草弯孢霉菌 *Curvularia eragrostidis* QZ-2000),其中敌散克是主要针对马唐研制的真菌除草剂^[8]。另外,许多细菌及其代谢物也具有防除马唐的作用,如日本研发的细菌除草剂 Camperico(主要成分为甘蓝黑腐病黄单胞菌 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* JT4P82)已经商品化,链霉菌 *Streptomyces* sp. 638 产生的茴香毒素能防除马唐和稗草^[9],假单胞菌、欧文氏菌、细菌 S4^[10]对马唐也具有良好的防效。尽管已报道的对马唐有致病性的菌株有很多,但是真正商品化的防除马唐的微生物制剂种类相对较少,且由于各种生防菌株的寄主范围不同,其应用往往受到一定的限制,不能完全满足生产的需要。因此,继续分离、筛选和鉴定马唐生防菌株能够为研发新型、高效的生物除草剂提供微生物品种资源,具有重要的科学意义和广泛的应用前景。

已报道的马唐致病菌多是从罹病的叶片分离得到的,极少有从种子和罹病幼苗上分离得到^[11]。黑龙江大学微生物学重点实验室从罹病马唐幼苗的基部分离到一株能够有效抑制马唐种子萌发和幼苗生长的生防菌株,对其进行了形态学观察和 ITS 序列分析,为后续进一步研究其防除马唐的机理,开发新型除草剂奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

马唐种子:鉴于秋季采集的马唐种子萌发率较低,而越冬的种子萌发率较高,本试验采用的种子为

3 月末从黑龙江省齐齐哈尔市梅里斯区雅尔塞镇农田采集的自然条件下越冬的种子。

培养基:以马铃薯葡萄糖培养基(PDA)为固体培养基,在 PDA 的基础上,不添加琼脂为液体培养基,121℃灭菌 20 min。

试剂:葡萄糖、琼脂、次氯酸钠、CTAB、氯仿、异戊醇、异丙醇、无水乙醇、溴化乙锭、琼脂糖、dNTPs (2.5 mmol/L)、10×PCR Buffer、*Taq* DNA 聚合酶和 DNA Marker DL2000,均购于宝泰克有限公司。

仪器:DYY-12 电泳仪,北京六一仪器厂;Omega 10 UVP 凝胶成像系统,德国 UVP 公司;TC-512 Thermal Cycler PCR 仪,英国 Techne 公司;CX31 体视显微镜,奥林巴斯有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 马唐病原真菌的分离

挑选外观成熟饱满的马唐种子,用 2% 次氯酸钠消毒 5 min,无菌水冲洗 3 遍,用灭菌滤纸吸干种子表面残留的水分后,置于铺有灭菌的湿润滤纸的培养皿中,每皿加 10 mL 无菌水,25℃ 恒温保湿培养 7 d,观察萌发情况,分别挑取发病种子和发病幼苗上的菌丝体接种于 PDA 培养基上,待菌落形成后,挑取菌落边缘的菌丝体,纯化培养,备用。

1.2.2 马唐生防菌株的筛选

用无菌水冲洗各分离株培养物表面,制成 1×10^6 个/mL 的孢子悬浮液,对马唐种子浸种处理 6 h,以无菌水为对照。然后置于铺有灭菌滤纸的无菌 PDA 培养皿中,每皿 50 粒,每处理 3 次重复,25℃ 光照培养箱中保湿培养,记录种子萌发率,计算萌发抑制率。

1.2.3 菌株 HD-06 的发酵液对马唐的致病性

皿栽试验:将菌株 HD-06 在 PDA 培养基上培养 5 d,挑取菌丝体,接种于马铃薯葡萄糖液体培养基中(每瓶装液量为 50 mL/250 mL)中,28℃,180 r/min 发酵培养 4 d。发酵液用无菌水稀释至终浓度分别为 60%、40%和 20%,对马唐种子进行浸种处理,以无菌培养基作为对照,然后置于铺有灭菌保湿滤纸的无菌培养皿中进行萌发试验,每处理 3 次重复,调查种子的萌发率和萌发 6 d 后幼苗的发病率。

盆栽试验:为模拟大田土壤生态环境,采用未灭菌的花坛土壤进行盆栽试验。将花坛土与蛭石按照 1:1 的比例混合。选取直径 15 cm,高度 14 cm 的花盆,盆内装 2/3 的土。每盆播撒 100 粒成熟饱满的

马唐种子,对照组喷施 20 mL 无菌发酵培养液,处理组喷施 20 mL 发酵培养 4 d 的 HD-06 含菌发酵液,然后覆土 1 cm,表层土压实平整后,室内自然温度条件下培养。每处理 3 盆。定期观察记录各处理马唐生长情况,在接种 37 d 后进行调查并记录数据。

1.2.4 生防菌株的鉴定

1.2.4.1 形态观察

将菌株 HD-06 接种于 PDA 平板上,28℃ 连续培养 25 d,定期对菌株形态进行观察,测量和拍照。

1.2.4.2 分子生物学鉴定

采用 CTAB 法提取真菌 DNA,采用上海生工生物公司合成的引物 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATT-GATATGC-3') 和 ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCG-TAACAAGG-3')对菌株的 ITS 序列进行 PCR 扩增^[12]。50 μL PCR 反应体系:10 μmol/L 的上游引物和下游引物各 2 μL、DNA 模板 2 μL、10×PCR Buffer 5 μL、2.5 mmol/L dNTP Mixture 1 μL、5 U/μL TaqDNA 聚合酶 1 μL,补充 ddH₂O 至 50 μL。PCR 扩增反应程序:94℃ 预变性 5 min;95℃ 变性 1 min,54℃ 退火 40 s,72℃ 延伸 40 s,循环 34 次,产物送博仕生物公司进行测序。在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对分析,并应用 MEGA 5.1 软件构建系统发育树,初步确定其系统发育地位。

根据生防真菌的形态学特征及 ITS 序列分析,查阅植物病原真菌鉴定手册和相关文献,明确其分类地位^[13]。

1.3 计算和统计方法

萌发抑制率=(未萌发种子数/种子总数)×100%,利用 SPSS 软件 Duncan 氏多重比较进行差异显著性分析。种子萌发率=(已萌发种子数/种子总数)×100%,致病率=(发病株数/萌发总株数)×100%,用 EXCEL 软件 *t* 测验法分析检验处理间的效应,用 SPSS 软件 LSD 法检验平均值之间的差异。

2 结果与分析

2.1 马唐生防菌株的分离和筛选

从马唐种子和罹病幼苗基部共分离得到 6 株真菌。它们对马唐种子的萌发均表现出一定的抑制作用(表 1),其中菌株 HD-06 处理对马唐种子的萌发抑制率最高,为 43.0%,方差分析结果表明,各菌株间的萌发抑制率差异达到显著水平($F=38.95, P<0.05$)。

表 1 不同分离株对马唐种子萌发的影响¹⁾

Table 1 Effects of different isolates on seed germination of crabgrass	
菌株编号 Strain no.	萌发抑制率/% Germination inhibition rate
对照 Control	(9.33±3.06)e
HD-01	(24.67±5.03)cd
HD-02	(20.00±2.00)d
HD-03	(32.67±5.03)b
HD-04	(29.33±1.15)bc
HD-05	(40.67±3.06)a
HD-06	(43.00±1.00)a

1) 表中数据为 3 个重复的平均值±SD,同列中不同字母表明 $P=0.05$ 水平差异显著。
Data in the table are the averages of three replicates with SD; different letters in the same column indicate significant difference at 0.05 level.

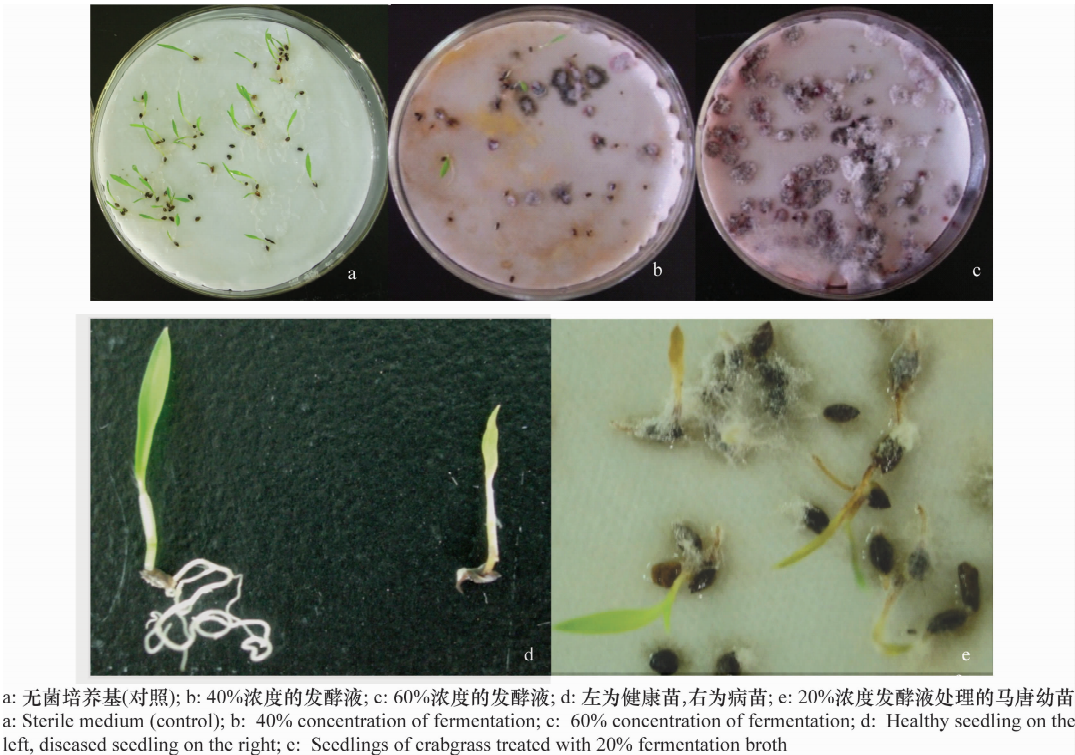
2.2 菌株 HD-06 发酵液对马唐的致病性

皿栽试验结果表明(表 2,图 1),当对照组马唐种子的萌发率达到 90%时,菌株 HD-06 的 20%、40%和 60%浓度发酵液处理的种子萌发率仅为 30%、10%和 0($F=1733.33, P<0.01$),差异达到极显著水平,说明 HD-06 的发酵液对马唐种子的萌发具有较好的抑制作用。各处理植株情况见图 1,对照(图 1a)幼苗叶片鲜绿,芽长和根长显著高于各发酵液处理(芽长 $F=13.1, P<0.05$;根长 $F=510.75, P<0.01$)(图 1b、c),而发酵液处理的种子已多数霉烂发病,看不出种子原来的形状,只能看到致病菌的霉层和菌丝体;少数萌发并长成幼苗的种子,其长势、芽长、根长均显著低于对照(图 1d)。虽然已萌发种子的霉烂程度要轻于未萌发的种子,仍能清晰地看出种子的形状,但其茎部和根部呈现明显的水渍状,且叶片明显变黄(图 1e)。

表 2 HD-06 发酵液对马唐种子萌发影响的皿栽试验结果¹⁾

Table 2 Effects of HD-06 fermentation broth on the seed germination of crabgrass in the dish experiments			
发酵液浓度/% Concentration of fermentation liquid	发芽率/% Germination rate	芽长/mm Bud length	根长/mm Root length
0(CK)	90±3.08	8.4±1.49	18.9±0.75
20	30±4.06**	4.05±0.82*	3.33±0.62**
40	10±2.38**	—	—
60	0	—	—

1) 表中数据为 10 个重复的平均值±SD,表中数据后 * 表示显著差异,** 为极显著差异,下同。
Data are the means of 10 replicates with SD. *, significant difference; **, extremely significant difference; the same below.



a: 无菌培养基(对照); b: 40%浓度的发酵液; c: 60%浓度的发酵液; d: 左为健康苗, 右为病苗; e: 20%浓度发酵液处理的马唐幼苗
a: Sterile medium (control); b: 40% concentration of fermentation; c: 60% concentration of fermentation; d: Healthy seedling on the left, diseased seedling on the right; e: Seedlings of crabgrass treated with 20% fermentation broth

图 1 菌株 HD-06 对马唐种子萌发和幼苗生长的影响

Fig. 1 Effects of strain HD-06 on the seed germination and seedling growth of crabgrass

盆栽试验结果(表 3)表明,对照组与处理组间的发芽率、致病率、株高以及单株地上部干重都存在显著差异(发芽率 $F=45.0, P<0.01$; 致病率 $F=74.33, P<0.01$; 株高 $F=13.77, P<0.05$; 单株结籽数 $F=1.94, P>0.05$; 单株地上部干重 $F=64.66, P<0.01$)。说明施用菌株 HD-06 可以起到抑制马唐种子萌发和幼苗生长的作用,具有较好的

除草潜力。当然,可能由于土壤中的状况比较复杂,有较多的物理化学和生物方面的因素影响马唐的萌发和生长,导致盆栽防治效果不如皿栽防治效果好。这也说明,要想让生防菌株在田间表现更好的除草效果,除了需要高效菌株外,还需要合理的制剂方案,使用合理的助剂和施用方法,才能进一步提高微生物除草剂的应用效果。

表 3 HD-06 发酵液对马唐的盆栽试验结果

Table 3 Results of pot experiment of HD-06 fermentation broth against crabgrass

组别 Group	发芽率/% Germination rate	致病率/% Morbidity	株高/cm Plant height	单株结籽数/粒 Seed number per plant	单株地上部干重/g Dry weight per plant
对照组 Control group	57.33±2.05	14.02±1.91	10.8±1.17	5.83±1.38	0.75±0.04
处理组 Treatment group	38.33±4.99**	47.53±5.15**	7.36±0.66*	4.07±1.18	0.27±0.08*

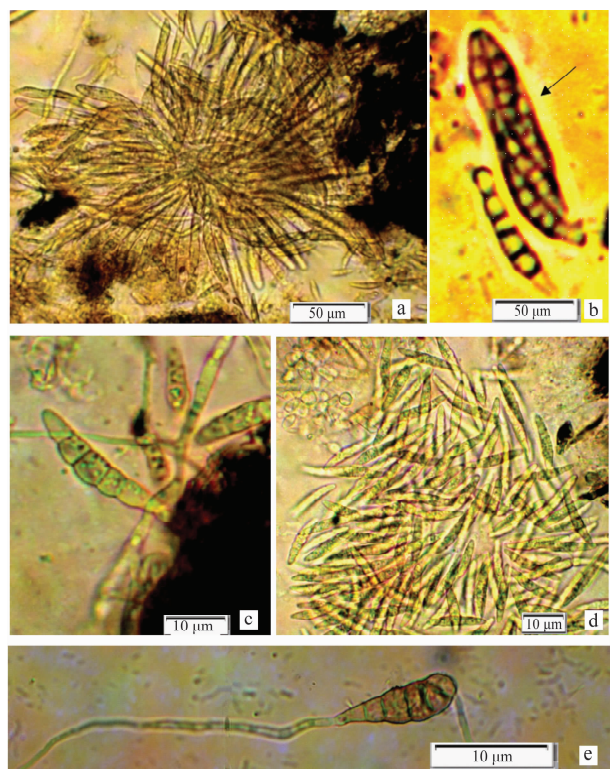
2.3 菌株 HD-06 的鉴定

2.3.1 形态观察

对菌株 HD-06 的形态观察结果表明,在 PDA 培养基上,菌落正面蓝灰色,菌丝向上生长,毛绒状;菌落背面黑褐色,能观察到小黑点状的子囊壳,针刺时有坚硬感。培养 15~20 d 时,挑取小黑点部位压碎制片,在显微镜下观察,能看到大量的子囊簇生在垫状结构上(图 2a)。子囊顶端圆,壁薄,圆柱状,大

小为(52~103) $\mu\text{m}\times(7.7\sim11.6)\mu\text{m}$,内含有 8 个子囊孢子,具有胶质鞘(图 2b);子囊孢子单列至 3 列,多为纺锤形,直或稍弯曲,大小(20.6~36) $\mu\text{m}\times(3.9\sim5.2)\mu\text{m}$,L/W 约为 5.2,被 5 个隔膜分成 6 个细胞,中间细胞膨大,一端细胞略尖,另一端有一个尖细的柄细胞(图 2c, d, e),中间的 2~3 个细胞均分布有较多的滴状油球。子囊孢子为黄绿色,中间两个细胞颜色较深(图 2c, e)。孢子萌发时,颜

色变深,呈褐色,细胞整体明显膨大,尤其是顶部细胞膨大成钝圆状,孢子一端萌发出丝状体(图 2e)。



a: 子囊着生方式(160×); b: 子囊内含8个子囊孢子(640×)。箭头所指为胶质鞘; c: 子囊(400×); d: 子囊孢子(400×); e: 萌发状态的子囊孢子(640×)。比例尺 a, b=50 μm; c, d, e=10 μm
a: Attachment mode of asci (160×); b: Each ascus contains eight ascospores (640×). The arrow indicates the ascospore sheath; c: Asci (400×); d: Ascospores (400×); e: Germinating ascospores (640×). Scale bars: a, b=50 μm; c, d, e=10 μm

图 2 菌株 HD-06 的形态特征

Fig. 2 Morphological characteristics of strain HD-06

2.3.2 菌株 HD-06 的 ITS 序列分析

菌株 HD-06 的 ITS 序列长度为 613 bp,将 ITS 序列提交到 NCBI 数据库中,应用 BLAST 软件从数据库中搜索出相关菌株的 ITS 序列,与已知菌的 ITS 序列进行同源性比较,分析其系统发育关系。GenBank 数据库比对结果表明,菌株 HD-06 的 ITS 序列(MK110375)与座囊菌纲格孢腔菌目的暗球腔菌属真菌 *Phaeosphaeria* sp. CBS123.76(KF251194.1) 和小球腔菌属 *Leptosphaeria* sp. VegaE4-83 (EF694661.1) 相似度均为 99%,集合在下一大分支(图 3),且暗球腔菌属真菌和小球腔菌属真菌的 ITS 序列在系统发育上极为相近,即菌株 HD-06 可能是格孢腔菌目真菌中的暗球腔菌属或小球腔菌属真菌。

2.3.3 鉴定结论

菌株 HD-06 的形态学特征符合子囊菌亚门座囊菌纲格孢腔菌目的形态学特征^[14]。暗球腔菌属 *Phaeosphaeria* 和小球腔菌属 *Leptosphaeria* 都是格孢腔菌目中的大属,而且亲缘关系较为相近,它们的 ITS 序列在系统发育上界限并不清晰,建属初期关于它们的分类学地位一直存在争议^[15]。Holm 在格孢菌科的研究中,将 *Phaeosphaeria* 界定为一个独立的属,理由是这类菌的子囊座具有拟侧丝,将 *P. oryzae* I. Miyake 定为模式种,并将原来属于 *Leptosphaeria* Ces. & De Not. 的 17 个具有由拟薄壁组织构成的小子囊座和具单子叶植物寄主的种移入 *Phaeosphaeria* 中^[16]。李文英等利用 18S 和 28S

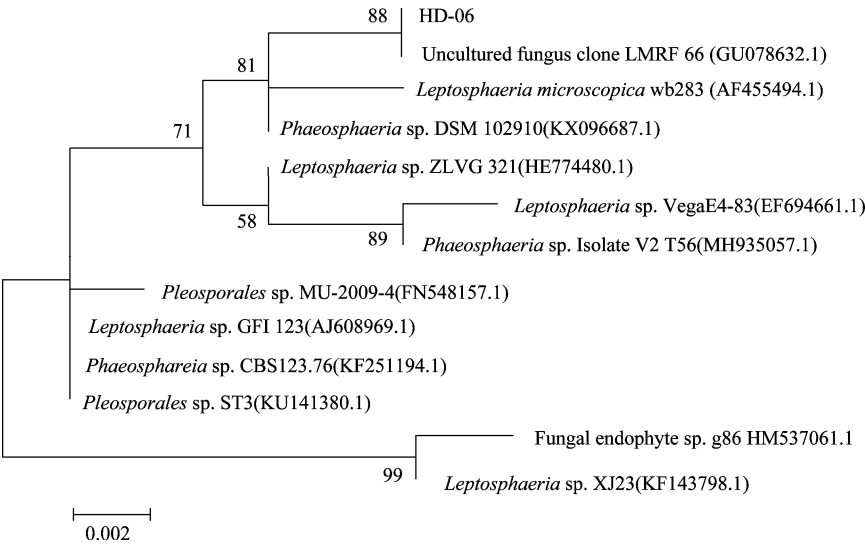


图 3 基于菌株 HD-06 ITS 序列构建的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on ITS sequences of strain HD-06 and its related strains

序列对座囊菌目及相关类群属间关系的系统学进行了初探,发现格孢腔菌目参试的 7 个属形成一个单系群,但属间的支持率非常低^[17]。分子系统学研究表明子囊及子囊孢子的形态及寄主范围(侵染单子叶植物的通常为 *Phaeosphaeria*,侵染双子叶植物的通常为 *Leptosphaeria*)对界定这两个属菌株的分类地位非常重要^[18]。菌株 HD-06 所侵染的马唐为单子叶植物,因此,根据其寄主,我们将菌株 HD-06 初步鉴定为暗球腔菌属 *Phaeosphaeria* 真菌。

3 讨论

马唐是世界性恶性杂草,现有的微生物源除草剂还不能满足农业的需求。因此,广泛筛选对马唐具有防除作用的生防微生物,具有较重要的科学意义。我们分离到的生防真菌 HD-06 的发酵液能够抑制马唐种子的萌发,对马唐幼苗有强致病性,具有开发为生物除草剂的潜力,经形态学、分子生物学特性及其侵染单子叶植物的综合特征,鉴定该菌株为暗球腔菌属真菌。目前相关文献已经报道了 10 个属的真菌对马唐具有良好的防除效果,包括刺盘孢属 *Colletotrichum*、疫霉属 *Phytophthora*、镰刀菌属 *Fusarium*、交链孢属 *Alternaria*、柄锈菌属 *Puccinia*、尾孢属 *Cercospora*、叶黑粉菌属 *Entyloma*、壳单孢菌属 *Ascochyta*、核盘菌属 *Sclerotinia*、弯孢属 *Curvularia*^[19],而上述 10 个属的真菌多数是从马唐叶片分离得到的,至今未见有关在马唐的种子上分离到暗球腔菌属真菌的报道。菌株 HD-06 的分离与鉴定,扩大了马唐生防菌的资源库。

到目前为止,暗球腔菌属 *Phaeosphaeria* 已有 114 个种^[20],中国对该属研究报道较少,乔倩等曾报道了中国黄海黄岛海域潮间带木上的 2 个中国新记录种新海暗球腔菌 *P. neomaritima* 和高山暗球腔菌 *P. subalpina*^[21];于辉霞等报道了来自福建武夷山、安徽黄山和山东昆嵛山的 3 个中国新记录种,肩状暗球腔菌 *P. humerata*、马西山暗球腔菌 *P. marciensis* 和香蒲暗球腔菌 *P. typharum*^[20]。但是在马唐上未见分离到该属致病真菌的报道。

4 结论

HD-06 为暗球腔菌属 *Phaeosphaeria* 真菌,该菌株 60%浓度的发酵液对马唐种子的萌发抑制率为 100%,处理后马唐幼苗发病率达到 100%;在盆

栽试验中发现经其发酵液处理后的马唐种子的萌发抑制率和幼苗发病率均远远高于空白对照组,且对马唐植株的株高、结籽数以及干重都有显著影响,显示出对马唐的萌发和生长都有很好的抑制效果。今后我们将对菌株 HD-06 的寄主范围 and 安全性进行评估,对其侵染和发病过程进行观察,分析其致病机理,并在此基础上对其发酵条件进行优化,对发酵液中能够防除马唐的有效物质进行分离纯化,为开发新型马唐生物除草剂奠定基础。

参考文献

- [1] 李健,李岩,高兴祥,等. 马唐生防菌厚垣孢镰刀菌 ZC201301 的生物学特性研究[J]. 草业学报, 2016, 25(3):234-239.
- [2] 陈世国,强胜,毛婵娟. 草甘膦作用机制和抗性研究进展[J]. 植物保护, 2017, 43(2):17-24.
- [3] GREEN J M. Current state of herbicides in herbicide-resistant crops [J]. Pest Management Science, 2014, 70(9):1351-1357.
- [4] 李玉,宗涛,杨浩娜,等. 长江中下游棉田马唐 (*Digitaria sanguinalis*) 对草甘膦的抗性初步研究[J]. 棉花学报, 2016, 28(3): 300-306.
- [5] LI Jiao, LI Mei, GAO Xingxiang, et al. A novel amino acid substitution Trp574Arg in acetolactate synthase (ALS) confers broad resistance to ALS-inhibiting herbicides in crabgrass (*Digitaria sanguinalis*) [J]. Pest Management Science, 2017, 73(1):2538-2543.
- [6] MEI Yu, SI Chong, LIU Mingjie, et al. Investigation of resistance levels and mechanisms to nicosulfuron conferred by non-target-site mechanisms in large crabgrass (*Digitaria sanguinalis* L.) from China [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2017, 141:84-89.
- [7] 屈洋,冯佰利. 杂草生物控制技术研究进展[J]. 中国农学通报, 2019, 35(4):114-121.
- [8] 王建军,朱云枝,赵敏,等. 画眉草弯孢霉菌株 QZ-2000 与低剂量化学除草剂复配增效机制研究[J]. 河南农业科学, 2010, 39(10):65-67.
- [9] 冀营光,黄亚丽,史延茂,等. 细菌除草剂马唐致病菌的筛选[J]. 生物技术, 2006, 16(3):71-74.
- [10] 杨叶,胡美姣,王兰英. 马唐草新月弯孢霉生物学特性及其代谢产物活性测定[J]. 中国生物防治, 2009, 25(2):154-159.
- [11] IKLEY J T, WISE K A, JOHNSON W G. Annual ryegrass (*Lolium multiflorum*), johnsongrass (*Sorghum halepense*), and large crabgrass (*Digitaria sanguinalis*) are alternative hosts for *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis*, causal agent of goss's wilt of corn [J]. Weed Science, 2017, 63 (4):901-909.
- [12] KHAN A M, BHADAURIA S. Molecular characterization of keratin degrading fungi isolated from semi-arid soil by PCR using ITS4 and ITS5 primers [J/OL]. Journal of King Saud University-Sci-

ence, 2018. DOI: 10.1016/j.jksus.2018.04.014.

- [13] SOUZA A R C D, BALDONI D B, LIMA J, et al. Selection, isolation, and identification of fungi for bioherbicide production [J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2016, 48(1):101–108.
- [14] SENANAYAKE I C, JEEWON R, CAMPORESI E, et al. *Sulcispora supratumida* sp. nov. (Phaeosphaeriaceae, Pleosporales) on *Anthoxanthum odoratum* from Italy [J]. *Journal Citation Reports*, 2018, 38: 35–46.
- [15] HYDE K D, JONES E B G, LIU Jiankui, et al. Families of Dothideomycetes; In loving memory of Majorie Phyllis Hyde (affectionately known as Mum or Marj), 29 August 1921–18 January 2013—without Mum's determination, a character passed on to children, this treatise would never have been completed—K. D. Hyde [J]. *Fungal Diversity*, 2013, 63(1):1–313.
- [16] HOLM L. Etudes taxonomiques sur les pleosporacées [J].
- (上接 39 页)
- [17] GANDHE A S, JOHN S H, NAGARAJU J. Noduler, a novel immune upregulated protein mediates nodulation response in insects [J]. *Journal of Immunology*, 2007, 179(10): 6943–6951.
- [18] DZIARSKI R. Peptidoglycan recognition proteins (PGRPs) [J]. *Molecular Immunology*, 2004, 40(12): 877–886.
- [19] KANG Daiwu, LIU Gang, LUNDSTROM A, et al. A peptidoglycan recognition protein in innate immunity conserved from insects to humans [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(17): 10078–10082.
- [20] SWAMINATHAN C P, BROWN P H, ROYCHOWDHURY A, et al. Dual strategies for peptidoglycan discrimination by peptidoglycan recognition proteins (PGRPs) [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(3): 684–689.
- [21] HOFFMANN J A. The immune response of *Drosophila* [J]. *Nature*, 2003, 426(6962): 33–38.
- [22] GOTTAR M, GOBERT V, MICHEL T, et al. The *Drosophila* immune response against Gram-negative bacteria is mediated by a peptidoglycan recognition protein [J]. *Nature*, 2002, 416(6881): 640–644.
- [23] DAWADI B, WANG Xinghong, RONG Xiao, et al. PGRP-LB homolog acts as a negative modulator of immunity in maintaining the gut-microbe symbiosis of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2018, 86(9): 65–77.
- [24] 张玉清. 小菜蛾免疫 Bt 动力学的 DGE 分析及其 PGRP-LB 基因的克隆[D]. 广州:华南农业大学, 2016.
- [25] 王爱琳. PGRP-LB 和 PGRP-SB 基因在橘小实蝇免疫及肠道微生物调控中的作用研究[D]. 武汉:华中农业大学, 2015.
- [26] DOUGLAS A. Lessons from studying insect symbioses [J]. *Cell Host and Microbe*, 2011, 10(4): 359–367.
- [27] ANSELME C, VALLIER A, BALMAND S, et al. Host

Symbolae Botanicae Upsalienses, 1957, 14(3):1–188.

- [17] 李文英, 庄文颖. 座囊菌目及相关类群属间关系的系统学初探 [J]. *菌物学报*, 2009, 28(2): 161–170.
- [18] SENANAYAKE I C, CROUS P W, GROENEWALD J Z, et al. Families of Diaporthales based on morphological and phylogenetic evidence [J]. *Studies in Mycology*, 2017, 86(C):217–296.
- [19] ZHANG Lihui, KANG Zhanhai, JIAO Xu, et al. Isolation and structural identification of herbicidal toxin fractions produced by *Pythium aphanidermatum* [J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2010, 9(7):995–1000.
- [20] 于辉霞, 迟胜起, 李秀岚, 等. 暗球腔菌属三个中国新记录种 [J]. *菌物学报*, 2013, 32(1):136–141.
- [21] 乔倩, 金静. 暗球腔菌属的 2 个中国新记录种 [J]. *青岛农业大学学报(自然科学版)*, 2011, 28(1):44–46.

(责任编辑: 田 喆)

PGRP gene expression and bacterial release in endosymbiosis of the weevil *Sitophilus zeamais* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(10): 6766–6772.

- [28] GENDRIN M, TURLURE F, RODGERS F H, et al. The peptidoglycan recognition proteins PGRP LA and PGRP-LB regulate *Anopheles* immunity to bacteria and affect infection by *Plasmodium* [J]. *Journal of Innate Immunity*, 2017, 9(4): 333–342.
- [29] KAMATH R S, FRASER A G, DONG Y, et al. Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi [J]. *Nature*, 2003, 421(6920): 231–237.
- [30] 黄颖. 蛭蟥体内环境对 Bt 杀虫活性的影响[D]. 北京:中国农业科学院, 2017.
- [31] WONG M L, MEDRANO J F. Real-time PCR for mRNA quantitation [J]. *Biotechniques*, 2005, 39(1): 75–85.
- [32] 贾春生. 利用 SPSS 软件计算杀虫剂的 LC₅₀ [J]. *昆虫知识*, 2006, 43(3): 414–417.
- [33] YIN Jiao, WANG Chaoqun, FANG Chiqin, et al. Functional characterization of odorant-binding proteins from the scarab beetle *Holotrichia oblita* based on semiochemical-induced expression alteration and gene silencing [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2019, 104: 11–19.
- [34] ZATTARA E E, MACAGNO S, SHIGENOBU S, et al. Development of functional ectopic compound eyes in scarabaeid beetles by knockdown of *orthodenticle* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(45): 12021–12026.
- [35] SHAN Yueming, SHU Changlong, CRICKMORE N, et al. Cultivable gut bacteria of scarabs (Coleoptera:Scarabaeidae) inhibit *Bacillus thuringiensis* multiplication [J]. *Environmental Entomology*, 2014, 43(3): 612–616.
- [36] 李如美, 王少丽, 张友军. 显微注射构建烟粉虱的 RNAi 技术体系 [J]. *昆虫知识*, 2015, 52(2): 504–509.

(责任编辑: 田 喆)