聊城市仓储玉米籽粒霉烂病原菌的分离与鉴定

孙 华， 郭 宁， 丁梦军， 张海剑， 石 洁*， 刘树森

（河北省农林科学院植物保护研究所，农业部华北北部作物有害生物综合治理重点实验室，
河北省农业有害生物综合防治工程技术研究中心，保定 071000）

摘要 为了明确聊城市引起仓储玉米籽粒霉烂的病原菌种类，采用形态学和分子生物学相结合的方法对54份样本进行了病原菌分离和鉴定。结果表明，优势病原菌为拟轮枝镰孢 *Fusarium verticillioides*，其次为哈茨木霉复合种 *Trichoderma harzianum* species complex，分离频率分别为31.48%和24.07%，其他病原菌如禾谷镰孢复合种 *F. graminearum* species complex、层出镰孢 *F. proliferatum*、棘孢木霉 *T. asperellum*、黑曲霉 *Aspergillus niger*、黄曲霉 *A. flavus*、草酸青霉 *Penicillium oxalicum* 和玉蜀黍丝核菌 *Rhizoctonia zeae* 的分离频率分别为9.26%、1.85%、1.85%、5.56%、5.56%、14.81%和3.70%。基于11个哈茨木霉复合种分离物的 *EF-1α* 基因序列进行了系统发育分析，结果表明该地区分离到的均为非洲哈茨木霉 *T. afroharzianum*。致病性测定结果显示，非洲哈茨木霉是玉米穗腐病的致病菌且对玉米产量有一定影响。

关键词 仓储； 籽粒霉烂； 病原菌； 哈茨木霉

中图分类号： S 432.44 **文献标识码**： A **DOI**： 10.16688/j.zwbh.2018238

Isolation and identification of pathogens causing stored maize kernel rot in Liaocheng

SUN Hua， GUO Ning， DING Mengjun， ZHANG Haijian， SHI Jie， LIU Shusen

（*Plant Protection Institute*， *Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences*；
IPM Centre of Hebei Province；*Key Laboratory of IPM on Crops in Northern Region of North China*，*Ministry of Agriculture*，*Baoding* 071000，*China*）

Abstract In order to clarify the pathogens of maize kernel rot during storage in Liaocheng city, the fungi in 54 samples were isolated and identified by a combination of morphological and molecular methods. The results showed that the dominant fungus was *Fusarium verticillioides*, followed by *Trichoderma harzianum* species complex (THSC), which were isolated by 31.48% and 24.07%, respectively. The isolation frequencies of other fungi such as *F. graminearum* species complex, *F. proliferatum*, *T. asperellum*, *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Penicillium oxalicum* and *Rhizoctonia zeae* were 9.26%, 1.85%, 1.85%, 5.56%, 5.56%, 14.81% and 3.70%, respectively. Phylogenetic analysis based on the *EF-1α* sequences of 11 THSC isolate showed that all isolates in this region were *T. afroharzianum*. Pathogenicity test revealed that *T. afroharzianum* was the pathogen of maize ear rot and had some negative effect on corn yield.

Key words storage； kernel rot； pathogens； *Trichoderma harzianum*

玉米是三大粮食作物之一，在食品和工业等方面应用广泛。穗腐病菌不仅发生在玉米生长后期，也可发生在贮藏期造成籽粒霉烂，严重影响玉米的产量和质量。病原菌产生的毒素等次生代谢产物会引起人畜中毒，严重者甚至造成死亡[1]。

近年来，不断有引起玉米穗腐病病原菌种类的报道，但大多数是在玉米生长后期进行样本采集，且多数地区的优势病原菌多为拟轮枝镰孢或禾谷镰孢复合种[2-3]，而关于在贮藏过程中引起玉米籽粒霉烂的病原菌种类的研究尚未见报道。温度和湿度是影

收稿日期： 2018-06-05 **修订日期**： 2018-07-20
基金项目： 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-02)
* 通信作者 E-mail：shij99@163.com

响穗腐病发生的主要因素，玉米灌浆成熟阶段遇到连续阴雨天可加重穗腐病的发生，玉米在贮存过程中，当贮存温度高于 10℃或籽粒含水量大于 14%时，也可加重籽粒霉烂[4]。

现有研究表明哈茨木霉复合种 *Trichoderma harzianum* species complex 包括至少 14 个种：贵州木霉 *T. guizhouense*、哈茨木霉 *T. harzianum*、非钩木霉 *T. inhamatum*、*T. lentiforme*、*T. lixii*、*T. afarasin*、非洲哈茨木霉 *T. afroharzianum*、深褐木霉 *T. atrobrunneum*、*T. camerunense*、*T. endophyticum*、*T. neotropicale*、*T. pyramidale*、*T. rifaii* 和西蒙斯木霉 *T. simmonsii*[5]。本研究在对采自山东省聊城市农户家中贮藏的籽粒霉烂的玉米样本进行病原菌分离鉴定的基础上，采用 elongation factor-1α（*EF*-1α）基因序列对分离到的哈茨木霉复合种进行分子鉴定，以明确引起山东省聊城市玉米贮藏过程中籽粒霉烂的木霉种类，为玉米在贮藏过程中的防治籽粒霉烂提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

玉米籽粒霉烂样本：高唐县 11 份、东昌府区 11 份、冠县 5 份、茌平县 10 份、阳谷县 17 份。

马铃薯葡萄糖琼脂培养基（PDA）：马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂粉 20 g、蒸馏水 1 L。

试剂：2×*Es Taq* Master Mix，北京康为世纪生物科技有限公司；真菌基因组 DNA 提取试剂盒，北京艾德莱生物科技有限公司；DL2000 DNA Marker，TaKaRa 公司；50×TAE，上海生工生物工程有限公司；Biowest Agarose G-10，南京生兴生物技术有限公司。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

仪器：PCR 仪，东胜龙 ETC-811；GelDoc XR+凝胶成像分析系统，美国 Bio-Rad 公司；DYY-11 型电泳仪，北京六一仪器厂；Neofuge 15R 台式高速冷冻离心机，上海力申科学仪器有限公司；HWS12 型电热恒温水浴锅，上海一恒科学仪器有限公司。

1.2 病原菌分离鉴定

取发病籽粒置于 2.0%的次氯酸钠溶液中浸泡 5 min，再以无菌水冲洗 3 遍，用灭菌滤纸吸干籽粒表面水分后将其放置在 PDA 平板上，于 27℃黑暗条件下培养 3～5 d，待长出菌丝后进行分离纯化获得单孢菌株，在新的 PDA 平板上 27℃黑暗培养 3～5 d 后，参照《真菌鉴定手册》[6]和《中国真菌志-青霉属及其相关有性型属》[7]，根据菌落形态和分生孢子的大小及形态特征等对菌株进行初步的形态学鉴定。

将培养好的真菌用真菌基因组提取试剂盒提取基因组 DNA，用真菌特异性引物 ITS1/ITS4（ITS1：5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′；ITS4：5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′）[8]和镰孢菌延伸因子引物 EF1/EF2（EF1：5′-ATGGGTAAGGARGACAAGAC-3′；EF2：5′-GGARGTACCAGTSATCATGTT-3′）[9]进行分子生物学鉴定。PCR 反应体系为：模板 DNA 1.0 μL，10 μmol/L 上游引物和下游引物各 0.5 μL，2×*Es Taq* Master Mix 12.5 μL，加 ddH_2O 补足至 25.0 μL。PCR 反应程序为：95℃预变性 10 min；95℃变性 1 min，退火温度下退火 30 s（ITS1/ITS4：56℃；EF1/EF2：53℃），72℃延伸 45 s，共 38 个循环；72℃延伸 10 min，4℃保存扩增产物。PCR 产物在 1%琼脂糖凝胶上进行电泳检测。所有扩增产物均由生工生物工程（上海）股份有限公司测序，测序结果在 NCBI 进行 BLAST 比对。

1.3 哈茨木霉复合种鉴定

将经真菌通用引物 ITS1/ITS4 鉴定为哈茨木霉复合种的菌株，采用引物 EF1-728F（5′-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3′）[10]和 TEF1LLErev（5′-AACTTGCAGGCAATGTGG-3′）[11]对其 *EF*-1α 序列进行 PCR 扩增，PCR 反应体系和 PCR 反应程序见 1.2，其中退火温度为 53℃。PCR 产物在 1%琼脂糖凝胶上进行电泳检测。所有扩增产物由生工生物工程（上海）股份有限公司测序，测序结果在 NCBI 进行 BLAST 比对。以 GenBank 中哈茨木霉复合种相关序列为参考序列，利用 MEGA 5.2 软件，采用邻近法（neighbor-joining）构建系统发育树，进行哈茨木霉复合种下不同种的鉴定。

1.4 非洲哈茨木霉的致病性测定

将非洲哈茨木霉分离物在 PDA 培养基上 28℃培养 5 d，用无菌水冲洗菌落表面，获得分生孢子，经纱布过滤后，配制成孢子含量为 1×10^6 个/mL 的孢子悬浮液，采用花丝通道注射法接种到授粉后 3 d 的玉米果穗上。收获前进行调查，记录发病情况。

2 结果与分析

2.1 真菌的分离鉴定

经形态学鉴定，54 份样本中分离到的病原菌初

步划分为镰孢属 *Fusarium* spp.、木霉属 *Trichoderma* spp.、青霉属 *Penicillium* spp.、曲霉属 *Aspergillus* spp. 和丝核菌属 *Rhizoctonia* spp.;分子生物学鉴定结果进一步表明分离到的病原菌分别为拟轮枝镰孢 *F. verticillioides*、禾谷镰孢复合种 *F. graminearum* species complex、层出镰孢 *F. proliferatum*、哈茨木霉复合种 *T. harzianum* species complex、棘孢木霉 *T. asperellum*、黑曲霉 *A. niger*、黄曲霉 *A. flavus*、草酸青霉 *P. oxalicum*、短密青霉 *P. brevicompactum* 和玉蜀黍丝核菌 *R. zeae*。其中,除短密青霉外,其他真菌均是玉米穗腐病的已知致病菌。

2.2　真菌的分离频率

10 种真菌中,拟轮枝镰孢的分离频率最高,为 31.48%;哈茨木霉复合种次之,为 24.07%;然后为草酸青霉,为 14.81%。拟轮枝镰孢和哈茨木霉复合种在调查的 5 个县(或区)均有分布;草酸青霉仅在冠县未分离到;禾谷镰孢复合种仅在东昌府区、茌平县和阳谷县分离得到;黑曲霉仅在阳谷县和高唐县分离得到;黄曲霉仅在高唐县和东昌府区分离得到;玉蜀黍丝核菌仅在东昌府区和阳谷县分离得到;层出镰孢仅在东昌府区分离得到,棘孢木霉仅在高唐县分离得到,短密青霉仅在冠县分离到(表 1)。

高唐县拟轮枝镰孢的分离频率最高,为 45.45%,是该县的优势病原菌,哈茨木霉复合种次之,仅为 18.18%;东昌府区哈茨木霉复合种的分离频率最高,为 27.27%;冠县拟轮枝镰孢的分离频率最高,为 60.00%,是该县的优势病原菌;在茌平县,拟轮枝镰孢、哈茨木霉复合种、草酸青霉和禾谷镰孢复合种的分离频率相差不大;阳谷县拟轮枝镰孢和哈茨木霉复合种的分离频率相同,均为 29.41%,远高于其他病原菌的分离频率(表 1)。

表 1　山东聊城不同县(区)病原菌的分离频率[1)]

Table 1　Isolation rates of pathogens in different areas of Liaocheng, Shandong

病原菌 Pathogen	分离频率/% Isolation rate					平均分离频率/% Average isolation rate
	高唐县(11) Gaotang	东昌府区(11) Dongchangfu	冠县(5) Guan	茌平县(10) Chiping	阳谷县(17) Yanggu	
拟轮枝镰孢 *Fusarium verticillioides*	45.45	9.09	60	30	29.41	31.48
哈茨木霉复合种 *Trichoderma harzianum* species complex	18.18	27.27	20	20	29.41	24.07
草酸青霉 *Penicillium oxalicum*	9.09	9.09	—	30	17.65	14.81
禾谷镰孢复合种 *Fusarium graminearum* species complex	—	18.18	—	20	5.88	9.26
黑曲霉 *Aspergillus niger*	9.09	—	—	—	11.76	5.56
黄曲霉 *Aspergillus flavus*	9.09	18.18	—	—	—	5.56
玉蜀黍丝核菌 *Rhizoctonia zeae*	—	9.09	—	—	5.88	3.70
层出镰孢 *Fusarium proliferatum*	—	9.09	—	—	—	1.85
棘孢木霉 *Trichoderma asperellum*	9.09	—	—	—	—	1.85
短密青霉 *Penicillium brevicompactum*	—	—	20	—	—	1.85

1) 各地点后面括号中的数字代表该地点的样本数。
The numbers in brackets following the region represent the sample numbers at this location.

2.3　哈茨木霉复合种鉴定

用 *EF-1α* 基因特异引物扩增出一条约为 1 300 bp 的片段,利用 MEGA 5.2 软件,将哈茨木霉复合种分离物的 *EF-1α* 基因序列与 NCBI 上已有的贵州哈茨木霉、哈茨木霉、西蒙斯哈茨木霉、非洲哈茨木霉等采用邻近法(neighbor-joining)构建系统发育树,结果表明,11 个哈茨木霉复合种分离物均与非洲哈茨木霉聚在同一分支上,表明其为非洲哈茨木霉 *Trichoderma afroharzianum*(图 1),且在高唐县、东昌府区、冠县、茌平县和阳谷县均有分布。

2.4　非洲哈茨木霉的致病性测定

将鉴定为非洲哈茨木霉的病原菌接种玉米果穗后,玉米苞叶过早干枯,且在苞叶表面覆盖绿色和白色霉层(图 2a);果穗发生腐烂,不结实或结实籽粒较少(图 2b～c)。将发病组织进行病原菌分离纯化,经形态和分子鉴定仍为非洲哈茨木霉。

3　结论与讨论

国内外研究表明,玉米穗腐病的致病菌主要为拟轮枝镰孢及禾谷镰孢复合种,在本研究中,引起聊城市仓储玉米穗腐病的优势病原菌为拟轮枝镰孢,

占分离频率的 31.48%，但次优势病原菌为哈茨木霉复合种，占分离频率的 24.07%，而禾谷镰孢复合种的分离频率仅为 9.26%，这可能与哈茨木霉对禾谷镰孢复合种有较强的抑制作用有关[12]。

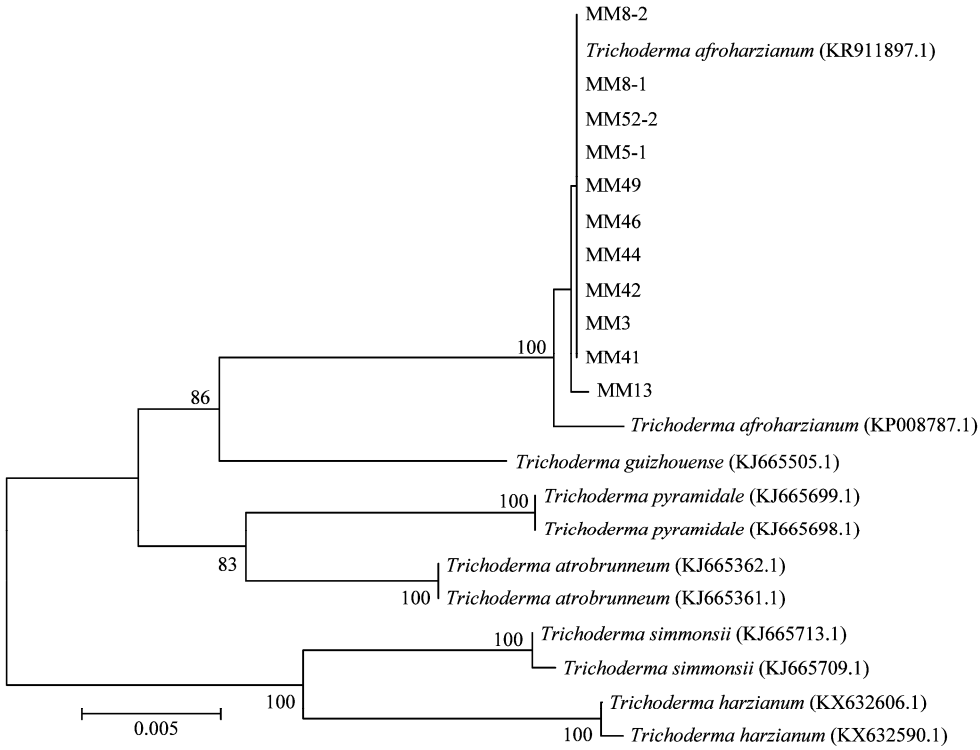


图 1　基于 *EF*-1α 基因序列构建的哈茨木霉复合种系统发育树

Fig. 1　Phylogenetic tree of *Trichoderma harzianum* species complex constructed based on *EF*-1α gene partial sequences

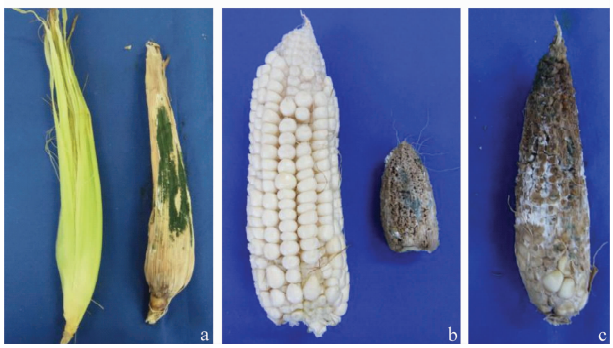


图 2　非洲哈茨木霉分离物回接玉米果穗发病症状

Fig. 2　Symptoms on maize ear inoculated by *Trichoderma afroharzianum* isolate

玉米收获前后易受到各种产毒真菌侵染，生长阶段易感镰孢菌，储存阶段易染曲霉[4]。在 19 世纪 70 年代美国就有关于贮存期引起玉米穗腐病青霉种类的报道[13]。在本研究中，虽然曲霉和青霉的分离频率均高于生长阶段采集样本的分离频率[14]，但远低于拟轮枝镰孢和哈茨木霉复合种的分离频率。这可能是由于哈茨木霉生长速度快、繁殖能力强、适应范围广等特性有关[15]。

近年来，关于哈茨木霉的研究主要集中在对植物病害的生物防治方面[16]，而关于哈茨木霉是病原菌的研究较少。姚瑞丽通过柯赫氏法则证实哈茨木霉是玉米穗腐病的致病菌[17]。在我国，关于哈茨木霉复合种的研究较少。张广志等在我国土壤中分离到哈茨木霉复合种中的非洲哈茨木霉、深褐木霉和西蒙斯木霉[18]。采用 rDNA-ITS 片段进行分子鉴定，只能将哈茨木霉鉴定到复合种水平，因此，多采用 *EF*-1α 基因序列对哈茨木霉复合种进行鉴定，本研究将从玉米籽粒样本上分离到的哈茨木霉复合种均鉴定为非洲哈茨木霉。按照柯赫氏法则对非洲哈茨木霉分离物进行致病性测定发现，非洲哈茨木霉能够引起玉米穗腐病，且能够侵染玉米的苞叶、籽粒和玉米轴，使玉米苞叶过早干枯，玉米结实率降低，严重影响玉米产量，病害症状与田间的木霉穗腐病相同。但非洲哈茨木霉是否对玉米质量有影响，有待进一步研究。

研究表明，玉米水分活度、环境温度是决定储存玉米籽粒霉变的主要因素。玉米籽粒含水量高或环境温度和湿度波动大可能导致玉米霉变[4]。因此，

（下转 195 页）

sponses of barley to leaf stripe (*Pyrenophora graminea*) under experimental conditions in southern Syria [J]. Journal of Phytopathology, 2004, 152(8/9): 519 - 523.

[3] PORTA-PUGLIA A, DELOGU G, VANNACCI G. *Pyrenophora graminea* on winter barley seed: effect on disease incidence and yield losses[J]. Journal of Phytopathology, 1986, 117(1):26 - 33.

[4] 陈桂华,褚金云,金保根,等. 金山区大麦条纹病暴发情况及原因分析[J]. 上海农业科技,2009(5):134.

[5] 靳生杰,洪平,张丽琼. 玉门市大麦条纹病的发生与防治[J]. 农业科技与信息,2008(13):35 - 36.

[6] 司二静. 大麦条纹病病原菌基因组测序及 SSR 标记开发[D]. 兰州:甘肃农业大学,2016.

[7] JAWHAR M, SANGWAN R S, ARABI M I E. Identification of *Drechslera graminea* isolates by cultural characters and RAPD analysis [J]. Cereal Research Communications, 2000, 28(1):87 - 93.

[8] 王春明,郑果,洪流,等. 甘肃省不同地区大麦条纹病病菌致病力测定及 RAPD 分析[J]. 中国植保导刊,2014,34(4):10 - 14.

[9] BAYRAKTAR H, AKAN K. Genetic characterization of *Pyrenophora graminea* isolates and the reactions of some barley cultivars to leaf stripe disease under greenhouse conditions [J]. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 2012, 36(2): 329 - 339.

[10] 司二静,杨淑莲,李葆春,等. 甘肃省大麦条纹病病原菌致病力分化、rDNA-ITS 及遗传多样性分析[J]. 植物保护学报,2017,44(1):84 - 92.

[11] TEKAUZ A. Reaction of Canadian barley cultivars to *Pyrenophora graminea*, the incitant of leaf stripe [J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 1983, 5(4): 294 - 301.

[12] GATTI A, RIZZA F, DELOGU G, et al. Physiological and biochemical variability[of the barley] in a population of *Drechslera graminea*[J]. Journal of Genetics & Breeding, 1992, 46: 179 - 186.

[13] 吴宽然. 大麦条纹病菌种群遗传结构分析及抗性种质鉴定[D]. 杭州:浙江师范大学,2013.

[14] WEILAND J J, STEFFENSON B J, CARTWRIGHT R D, et al. Identification of molecular genetic markers in *Pyrenophora teres* f. *teres* associated with low virulence on 'Harbin' barley [J]. Phytopathology, 1999, 89(2): 176 - 181.

[15] PECCHIONI N, FACCIOLI P, TOUBIA-RAHME H, et al. Quantitative resistance to barley leaf stripe (*Pyrenophora graminea*) is dominated by one major locus[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1996, 93(1/2): 97 - 101.

(责任编辑:杨明丽)

(上接 182 页)

明确引起仓储玉米籽粒霉变病原菌的种类,可为进一步防治玉米仓储病害提供理论依据。

参考文献

[1] MARASAS W F O. Fumonisins: their implications for human and animal health [J]. Natural Toxins, 1995, 3(4):193 - 198.

[2] 孙华,郭宁,石洁,等. 海南玉米穗腐病病原菌分离鉴定及优势种的遗传多样性分析[J]. 植物病理学报,2017,47(5):577 - 583.

[3] 孙华,张海剑,马红霞,等. 春玉米区穗腐病病原菌组成、分布及禾谷镰孢复合种的鉴定[J]. 植物病理学报,2018,48(1):8 - 15.

[4] 刘增然,张光一,王南南,等. 储存玉米中黄曲霉毒素主要产生菌的检测及污染预防研究[J]. 植物保护,2017,43(6):46 - 52.

[5] CHAVERRI P, BRANCOROCHA F, JAKLITSCH W, et al. Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains [J]. Mycologia, 2015, 107(3):558 - 590.

[6] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1979.

[7] 孔华忠. 中国真菌志-青霉属及相关有性型属[M]. 北京:科学出版社,2007.

[8] WHITE T J, BRUNS T, LEE S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [M]// INNIS M A, GELFAND D H, SNINSKY J J, et al. PCR Protocols: a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, 1990: 315 - 322.

[9] O'DONNELL K, WARD T J, ABERRA D, et al. Multilocus genotyping and molecular phylogenetics resolve a novel head blight pathogen within the *Fusarium graminearum* species complex from Ethiopia [J]. Fungal Genetics and Biology, 2008, 45(11):1514 - 1522.

[10] CARBONE I, KOHN L M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes [J]. Mycologia, 1999, 91(3): 553 - 556.

[11] JAKLITSCH W M, KOMON M, KUBICEK C P, et al. *Hypocrea voglmayrii* sp. nov. from the Austrian Alps represents a new phylogenetic clade in *Hypocrea*/*Trichoderma* [J]. Mycologia, 2005, 97(6): 1365 - 1378.

[12] 韩勇军. 哈茨木霉对禾谷镰孢病原菌的抑菌活性研究[J]. 湖北农业科学,2010,49(2):356 - 358.

[13] MISLIVEC P B, TUITE J. Species of *Penicillium* occurring in freshly-harvested and in stored dent corn kernels [J]. Mycologia, 1970, 62(1): 67 - 74.

[14] 秦子惠,任旭,江凯,等. 我国玉米穗腐病致病镰孢种群及禾谷镰孢复合种的鉴定[J]. 植物保护学报,2014,41(5):589 - 596.

[15] 张衡宇. 植病生防菌哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)的研究[D]. 福州:福建农林大学,2011.

[16] 陈凯,李纪顺,王贻莲,等. 洞庭湖湿地木霉多样性及生防活性[J]. 微生物学通报,2017,44(10):2307 - 2320.

[17] 姚瑞丽. 玉米穗腐病病原鉴定、产毒条件及田间防控研究[D]. 晋中:山西农业大学,2015.

[18] 张广志,张新建,陈泉,等. 哈茨木霉复合种内 3 个中国新记录种的分离和鉴定[J]. 山东科学,2015,28(6):43 - 46.

(责任编辑:杨明丽)