

罗海澜,王 飞,马旭园,等. 狗牙根黑粉菌冬孢子萌发影响因素及产孢培养基筛选[J]. 江苏农业科学,2014,42(11):166-168.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.11.057

狗牙根黑粉菌冬孢子萌发影响因素及产孢培养基筛选

罗海澜¹, 王 飞¹, 马旭园¹, 张群之¹, 罗海淑², 刘少娟¹

(1. 漯河医学高等专科学校/漯河市医学微生物工程重点实验室,河南漯河 462002;2. 江西省吉水县农业技术推广站,江西吉水 316000)

摘要:研究不同温度、水分含量、光照条件、pH 值对狗牙根黑粉菌冬孢子萌发的影响,结果表明,温度 23~28℃、光照与黑暗间隔 12 h、pH 值 5~7 的条件最适合冬孢子萌发;同时,还观察和描述了狗牙根黑粉菌冬孢子的形态特征和萌发过程;此外,还研究了不同培养基对次生小孢子形态及产孢数量的影响,结果发现 9 种培养基均能产孢,在 4% 葡萄糖酵母膏液体培养基中产孢量最多,存在 3 种不同形态的次生孢子,带荚膜的次生孢子无活性。

关键词:狗牙根黑粉菌;冬孢子;萌发率;产孢培养基;次生孢子

中图分类号:S432.4⁺4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)11-0166-03

狗牙根 [*Cynodon dactylon* (L.) Pers.] 因其根茎繁殖能力强、生长快、耐践踏、抗旱性强,成为铺设运动场、停机坪、高尔夫果岭、公园、庭院绿化的主要草坪草种^[1-2]。但近年来,狗牙根黑穗病在我国发生普遍且态势严重,严重影响我国草坪质量及其他场地绿化效果。狗牙根黑穗病是由担子菌亚门黑粉菌目黑粉菌属狗牙根黑粉菌引起的一种的真菌性病害。狗牙根黑穗病是系统侵染,引发全株性病害。最为直观明显的症状即开花期穗产生充满孢子堆的病穗,表现为一种典型的苗期侵染、花期发病的症状。感病植物不能正常开花结子,导致植株不育,一般 7—9 月为黑穗病发病高峰期^[3]。狗牙根黑粉菌主要靠冬孢子传播,匍匐茎也能传播。Garcia-Guzman 等发现,黑粉菌通过来自种皮或土壤的越冬孢子菌丝侵染发芽种子的胚芽鞘,并扩散至整个植物组织,黑粉菌对狗牙根的种子萌发、出苗无影响,但被其侵染的狗牙根匍匐枝的生长、干物质总量、竞争力都明显降低了^[4]。目前,国内对狗牙根黑穗病的关注不多,狗牙根黑粉菌的致病机理尚不清楚。因此,本研究对狗牙根黑粉菌冬孢子的萌发条件、萌发过程及黑粉菌产次生孢子培养基进行探索,为进一步研究狗牙根黑粉菌的致病机制及该病原菌与狗牙根之间的互作提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

狗牙根黑穗病标样采自漯河医学高等专科学校的校园草坪,室内自然风干后于室内纸袋保存。试验用冬孢子取自发病穗,黑粉菌菌株 LHL1 由笔者所在实验室分离、鉴定,保存于中国武汉菌株保藏中心。

1.2 冬孢子的分离

选取未抽穗的病穗,在超净工作台中用 75% 乙醇消毒

5 s,再用 0.1% 氯化汞消毒 4 min,然后用无菌水漂洗 5 次。用无菌镊子将穗外膜撕开,再轻刮下病穗上的黑粉菌冬孢子于无菌水中制成冬孢子悬浮液备用,在显微镜下用血球计数板统计,冬孢子的浓度为 10 万个/mL。

1.3 不同因素对冬孢子萌发的影响

1.3.1 光照对冬孢子萌发的影响 取 100 μL 冬孢子悬浮液并用三角玻璃棒均匀涂布于 PSA (马铃薯蔗糖固体培养) 平板上,将 PSA 平板放在温度为 28℃ 的培养箱内,且分别置于连续光照 (日光灯,光强 1 400 lx)、12 h/12 h 光暗交替、黑暗条件下培养,于 16 h 后显微镜下观察、统计并比较这 3 种条件下冬孢子的萌发率。

1.3.2 水分对冬孢子萌发的影响 室温下将冬孢子分别浸于无菌水中 0、12、24、36、72 h,吸取冬孢子悬浮液 100 μL 均匀涂布于 PSA 平板上,该平板放在 28℃、光照 (日光灯,光强 1 400 lx) 条件下的培养箱内培养,分别于 16 h 后显微镜下观察并统计不同浸水时间下的冬孢子萌发率。

1.3.3 温度对冬孢子萌发的影响 取 100 μL 冬孢子悬浮液并用三角玻璃棒均匀涂布于 PSA 平板上,将 PSA 平板放在光照 (日光灯,光强 1 400 lx) 条件下的培养箱中,分别在 15、18、23、28、33、38℃ 等 6 个温度条件下培养,16 h 后显微镜下观察并统计不同温度下的冬孢子萌发率。

1.3.4 pH 值对冬孢子萌发的影响 用 2 mol/L HCl 和 2 mol/L NaOH 调节 PSA 培养基的初始 pH 值为 4、5、6、7、8、9、10,取 100 μL 冬孢子悬浮液均匀涂布于 PSA 平板上,将 PSA 平板放在 28℃、光照 (日光灯,光强 1 400 lx) 条件下的培养箱中培养,16 h 后显微镜下观察并统计不同初始 pH 值的 PSA 培养基平板上冬孢子的萌发率。

1.4 狗牙根黑粉菌冬孢子萌发及形态观察

用改良玻片培养法观察冬孢子的萌发情况,具体做法如下:先将制备好的无菌冬孢子悬浮液与融化的无菌低熔点琼脂糖混合,用毛细滴管吸取孢子与琼脂糖混合液滴在无菌载玻片上,迅速盖上盖玻片并轻压使液滴分散成薄层,置于铺有滤纸的无菌培养皿中;再滴加数滴无菌水,盖上培养皿盖,整个过程在无菌超净台上完成。培养皿放置于 23℃ 光照培养箱中培养 6、24 h 后取出,经苯胺蓝染色 20 min,用脱色液脱

收稿日期:2013-12-12

基金项目:河南省漯河市科技计划。

作者简介:罗海澜(1979—),女,江西吉安人,硕士,讲师,主要从事生物化学及生物技术研究。Tel(0395)2385255;E-mail:xiaohailuol224@163.com。

通信作者:王 飞,博士,副教授,主要从事生物资源开发研究。Tel:(0395)2385255;E-mail:zhmdwf@163.com。

色 2 h 后于显微镜下观察冬孢子的萌发形态。

1.5 狗牙根黑粉菌产孢培养基的筛选试验

利用马铃薯葡萄糖液体培养基、马铃薯蔗糖液体培养基、燕麦液体培养基、麸皮液体培养基、玉米粉液体培养基、完全液体培养基、4% 葡萄糖酵母膏液体培养基、2% 甘油酵母膏液体培养基、狗牙根干草酵母膏液体培养基 9 种液体培养基分别对狗牙根黑粉菌产孢效果和孢子形态进行试验。

马铃薯葡萄糖液体培养基、马铃薯蔗糖液体培养基配方参照文献[5];燕麦液体培养基、麸皮液体培养基、玉米粉液体培养基配方参照文献[6];完全液体培养基配方参照文献[7];4% 葡萄糖酵母膏液体培养基、2% 甘油酵母膏液体培养基配方参照文献[8];狗牙根干草酵母膏液体培养基配方:50 g 狗牙根干草在锅里煮沸后继续煮 0.5 h,然后用纱布过滤得液体,添加 10 g 酵母膏,用自来水加到 1 000 mL。

将保存于 4 ℃ 营养琼脂斜面培养基上的 LHL1 菌株接种于 PSA 固体培养基上,28 ℃ 培养进行活化。无菌条件下用接种针从培养好的平皿中挑取一单菌落接种于装有 100 mL PS 液体培养基的 250 mL 三角瓶中,在恒温 28 ℃、转速 200 r/min 的摇床中培养 3 d,成为种子液培养。按 0.6% 接种量吸取种子液转接于含 50 mL 液体培养基的 250 mL 摇瓶中,在转速为 200 r/min 的条件下摇床振荡培养,摇菌 4 d 后,用胶头滴管吸 1 滴菌液于载破片上,苯胺蓝染色后,显微镜下观察次生孢子形态;菌液稀释 100 倍用血球计数板统计次生孢子的数量。

2 结果与分析

2.1 不同因素对冬孢子萌发的影响

2.1.1 光照条件对冬孢子萌发的影响 试验结果表明,光照、黑暗条件下,狗牙根黑粉菌冬孢子都能萌发,且光照能促进冬孢子萌发。持续光照培养的冬孢子萌发率为 31%,光照与黑暗间隔 12 h 培养的萌发率为 40%,持续黑暗培养萌发率为 27% 左右,说明在自然光周期条件下萌发较好,这与玉米瘤黑粉菌冬孢子萌发对光的需求^[9]一致。

2.1.2 水分条件对冬孢子萌发的影响 试验结果表明,冬孢子浸泡 0~72 h 都能萌发,且浸泡 48 h 的孢子萌发率最高;在 0~48 h 范围内随着浸水时间延长,冬孢子的萌发率有所提高。与水稻黑粉菌冬孢子要浸泡 24 h 才能萌发相比,狗牙根黑粉菌冬孢子萌发对水分的需求更低,这可能与在干燥器内保存比在室内纸袋中保存冬孢子散失的水分更多有关^[7]。然而,一直浸泡在无菌水中的冬孢子萌发率有所降低,这可能与水中氧气含量低,不能满足冬孢子萌发对氧气的需求有关。这与玉米瘤黑粉菌及水稻黑粉菌冬孢子试验的结果^[7,9]相似。

2.1.3 温度对冬孢子萌发的影响 图 1 显示,在 15~38 ℃ 范围内,冬孢子都能萌发。在 18~33 ℃ 下,冬孢子都能较好地萌发,其中 23 ℃ 左右最适合冬孢子萌发,此时在 PSA 平板上培养 16 h 的孢子萌发率高达 53%,培养 36 h 时萌发的孢子已长成菌落,无法再统计萌发率,此时肉眼可见白色菌落,说明狗牙根冬孢子萌发非常快。

2.1.4 pH 值对冬孢子萌发的影响 图 2 显示,在 pH 值为 4~10 的范围内,冬孢子均可以萌发;在 pH 值为 5~7 时,冬孢子萌发率较高。可见偏碱性环境不利于冬孢子萌发。

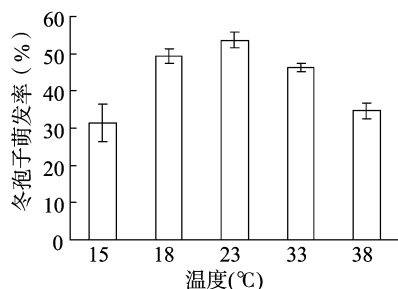


图1 温度对黑粉菌冬孢子萌发率的影响

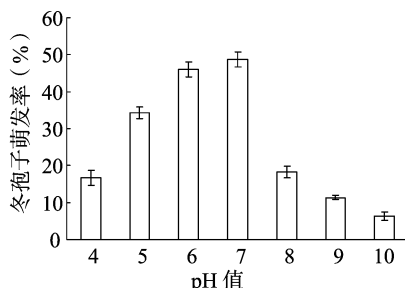
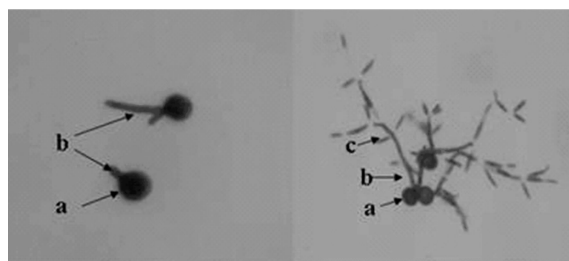


图2 pH 值对黑粉菌冬孢子萌发率的影响

2.2 狗牙根黑粉菌冬孢子形态及萌发过程

图 3 显示,狗牙根黑粉菌冬孢子淡褐色或棕色,近球形或卵形,直径为 7~9 μm,膜面光滑而薄,这与程建斌的描述^[3]相符。本试验结果显示,冬孢子培养 6 h 后开始萌发,24 h 后呈树枝状;冬孢子萌发产生先菌丝,一端萌发或两端同时萌发,先菌丝上侧生担孢子;先菌丝有隔,偶见长先菌丝,长先菌丝上不产生担孢子,短先菌丝上担孢子多形成树枝状。



a—冬孢子; b—先菌丝; c—担孢子

图3 黑粉菌冬孢子萌发产生先菌丝及担孢子 (400 ×)

2.3 LHL1 菌株的形态特征

冬孢子在 PSA 平板上萌发后形成雪花样白色菌落,从菌落中挑取单菌落进行分离培养得到菌株 LHL1。菌株 LHL1 在 PSA 平板上 28 ℃ 光照培养 2 周后,菌落直径达到 1.4 cm 左右,近圆形,边缘整齐,正面乳白色,质地近紧密为一薄层,背面黄褐色(图 4-A)。显微镜下 LHL1 菌为长条形,一端膨大,一端细长,分裂生长(图 4-B)。

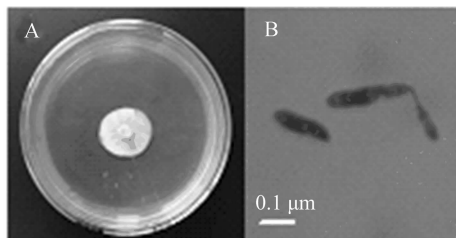


图4 LHL1的菌落及菌的形态

2.4 不同液体培养基对 LHL1 生物量及产孢的影响

如图 5 所示,9 种液体培养基以马铃薯蔗糖液体培养基生物量最大,其他从大到小依次为 4% 葡萄糖酵母膏培养基、2% 甘油酵母膏液体培养基、完全液体培养基、马铃薯葡萄糖液体培养基、玉米粉液体培养基、燕麦液体培养基、狗牙根干草酵母膏液体培养、麸皮液体培养基。图 5 还显示,9 种液体培养基均能够产生次生孢子,但不同培养基的产孢量和孢子形态不同,其中马铃薯蔗糖液体培养基产孢量最大,玉米粉液体培养基产孢量最小。在燕麦、玉米粉、麸皮、完全及甘油酵母膏液体培养基中既有次生孢子产生又有菌丝存在,这也可能是在这 5 种培养基中产生次生孢子少的原因之一。

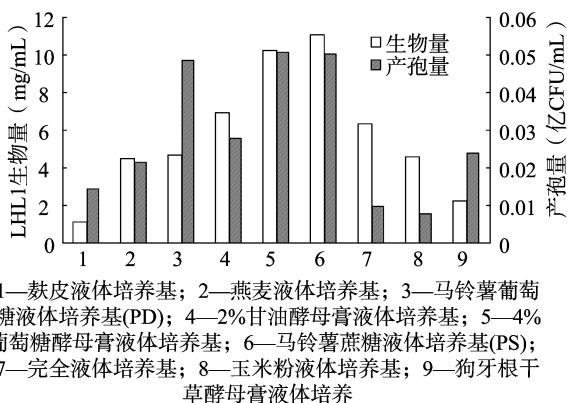
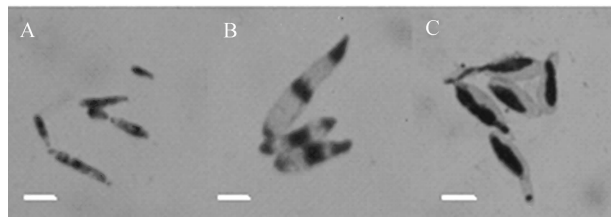


图5 不同培养基对 LHL1 生物量(干细胞质量)及产孢量的影响

狗牙根黑粉菌的次生孢子形态有 3 种,第 1 种形态见图 6-A,这种次生孢子小而细,9 种液体培养基除狗牙根干草酵母膏液体培养外都产生这种类型孢子;第 2 种形态见图 6-B,由狗牙根干草酵母膏液体培养产生,孢子个体大,中间间隔大,细胞质分布不均一;第 3 种形态见图 6-C,孢子有荚膜,此类孢子只在狗牙根干草马铃薯酵母膏液体中培养产生,在其他液体培养基和固体培养基中均无再生能力,其原因还有待进一步研究。



标尺=0.1 μm。A—2%甘油酵母膏液体培养基中次生孢子;B—狗牙根干草酵母膏液体培养基中次生孢子;C—带荚膜孢子

图6 黑粉菌的次生孢子

3 结论与讨论

综合结果与分析得出以下结论:(1)温度为 23~28℃、光照与黑暗间隔 12 h、pH 值为 5~7 的条件最适合狗牙根黑粉菌冬孢子萌发;(2)冬孢子萌发产生先菌丝,一端萌发或两端同时萌发,先菌丝上侧生担孢子;(3)9 种培养基均能产孢,以 4% 葡萄糖酵母膏、马铃薯葡萄糖、马铃薯蔗糖 3 种液体培养基产孢量最大,存在 3 种不同形态的次生孢子。

冬孢子从形成到萌发需要经历后熟期、休眠期、复苏期和萌发期 4 个时期,光照是打破冬孢子休眠的重要条件。本试验

结果显示,光照对狗牙根黑粉菌冬孢子的萌发并不是必要条件,这与水稻黑粉菌冬孢子在黑暗条件下不能萌发不同^[7],说明可能不同黑粉菌冬孢子萌发对光的需求不同,但本研究中 12 h 光暗交替培养能促进冬孢子萌发。水分是打破冬孢子休眠期进入复苏期的必要条件,但本试验中未浸水的冬孢子在 PSA 平板上也能萌发,这可能与笔者采用冬孢子的保存方式(纸包)有关。温度是影响冬孢子萌发的重要因素之一,狗牙根黑粉菌冬孢子在 15~38℃ 都能萌发,其中以温度为 23℃ 左右萌发率最高,这与水稻黑粉菌和玉米黑粉菌冬孢子的萌发温度^[7,9]较一致,与玉米丝黑穗病原菌冬孢子的最佳萌发温度为 28℃^[10]不同。pH 值对冬孢子的萌发影响很大,弱酸性至中性环境有利于冬孢子萌发(pH 值 5~7),偏碱性环境不利于冬孢子萌发。这与酸性条件促进玉米黑粉菌冬孢子、美味黑粉菌冬孢子萌发的结果^[9,11]较为接近。本试验中冬孢子萌发率偏低,可能与部分冬孢子因光照不足而没有完成后熟作用以及试验过程中使用了表面消毒剂等有关。

狗牙根黑穗病是一种苗期侵染、花期发病的病害,国内对该病原菌的研究鲜有报道,国外的研究显示狗牙根黑粉菌通过来自种皮或土壤越冬孢子的菌丝侵染发芽种子的胚芽鞘,并扩散至整个植物组织;但对狗牙根黑粉菌冬孢子的生物学特性及其具体的侵染过程、致病机理都未见报道。

通过 9 种液体培养基的产孢对比试验发现,9 种培养基均能产孢,以 4% 葡萄糖酵母膏、马铃薯葡萄糖、马铃薯蔗糖 3 种液体培养基产孢量较大,麸皮液体培养基产孢量最小。说明狗牙根黑粉菌产次生孢子对培养基要求不严,这与水稻黑粉菌^[7]不同,也为进一步研究该病原菌致病机理以及与寄主的互作提供了有力保障。笔者还发现,狗牙根黑粉菌存在 3 种不同形态的次生孢子,其中带荚膜的次生孢子无活性,其原因还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 孙吉雄. 草坪学[M]. 兰州:甘肃科学技术出版社,1989:98-99.
- [2] 唐欣,向佐湘,苏鹏. 狗牙根研究进展[J]. 作物研究,2009,23(增刊):383-386.
- [3] 程建武. 狗牙根黑穗病初报[J]. 中国草地,1992(1):73.
- [4] Garcia-Guzman G, Burdon J. Impact of the flower smut *Ustilago cynodontis* (Ustilaginaceae) on the performance of the clonal grass *Cynodon dactylon* (Gramineae) [J]. American Journal of Botany, 1997,84(11):1565-1571.
- [5] 方中达. 植物研究方法[M]. 北京:农业出版社,1979:83-87.
- [6] 邱海萍,柴荣耀,张震,等. 马唐致病菌株 Mds0404 的生物学特性[J]. 浙江农业学报,2008,20(3):163-167.
- [7] 陈胜军,王艳丽,张震,等. 稻粒黑粉菌冬孢子萌发影响因素及其产孢培养基的筛选[J]. 浙江农业学报,2011,23(3):572-576.
- [8] Durieu-Trautmann O, Tavlitzki J. Reversible and permanent effects of the carbon sources and various antibiotics on the morphology and metabolic properties of *Ustilago cynodontis* cells[J]. The Journal of Cell Biology, 1975,66(1):102-113.
- [9] 刘正坪,赵占军,张贵,等. 玉米黑粉病病原冬孢子生物学特性研究[J]. 现代化农业,1998,222(1):12-13.
- [10] 刘洪亮,王险峰,刘辉,等. 玉米丝黑穗病原菌冬孢子萌发条件研究[J]. 中国植保导刊,2007,27(12):5-8.
- [11] 徐蝉,张敬泽,王晓清,等. 美味黑粉菌冬孢子萌发条件的研究[J]. 长江蔬菜,2012(16):104-107.