

小麦冠腐病菌 (*Fusarium pseudograminearum*) FPCS3096 菌株产孢条件的研究

李湘民^{1,2}, 兰波¹, Liu Chunji², Kemal Kazan²

(1 江西省农业科学院 植物保护研究所 江西 南昌 330200; 2. 联邦科学院植物所 昆士兰生物区 澳大利亚 昆士兰 4067)

摘要:由真菌 *Fusarium pseudograminearum* 引起的小麦冠腐病是澳大利亚小麦生产上最严重的病害。为进行病害抗性鉴定和筛选抗病种质资源,需制备大量的病菌分生孢子。本试验以强致病性菌株 FPCS3096 为材料,开展了该菌株产孢条件的研究。结果表明:在 6 种培养基中,以 1/2 PDA 产孢量最大;在营养生长阶段,在菌丝长满平板后(28 °C 下需培养 6~7 d),延长培养时间(即继续培养),大大促进了后期的产孢,培养 12 d 的产孢量是培养 6 d 的 4 倍,而且在这一阶段,暗培养促进了产孢,连续暗培养的产孢数是连续光培养产孢数的 2 倍多。试验同时发现,在一定的范围内,培养皿内培养基的重量或平板培养基的厚度对产孢有很大的影响,量越多,产孢量越大,当培养基的重量比为 2 倍多时,产孢的数量比为 7~10 倍。与本实验室以前采用的在 PDA 培养基上培养、然后光照产孢的技术相比,现有的技术将产孢数量提高了 20~50 倍。

关键词: *Fusarium pseudograminearum* 营养生长阶段 暗培养 产孢

中图分类号: S435.121.4⁺9 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2011)04-0674-05

Studies on Conditions for Sporulation of Pathogen *Fusarium pseudograminearum*

LI Xiang-min^{1,2}, LAN Bo¹, Liu Chunji², Kemal Kazan²

(1. Plant Protection Institute, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang 330200 China; 2. CSIRO Plant Industry, Queensland Bioscience Precinct, 306 Carmody Road, St Lucia, Queensland 4067, Australia)

Abstract: *Fusarium pseudograminearum* (FPCS3096), the causal agent of wheat crown rot, is an economically important disease in Australia. The studies on conditions for sporulation of the pathogen were conducted in order to increase amount of sporulation for the purpose of artificial inoculation. The results showed that the amount of sporulation of FPCS3096 on 1/2PDA medium was the biggest of 6 kinds of media; that prolonging incubation time after the mycelium spreads all the plate (it took 6-7 days at 28 °C) during the mycelium growth stage would greatly enhance sporulation during the sporulation stage, and the amount of sporulation at a 12-days long incubation period was 4 times as high as that at a 6-days period; that also dark incubation during the mycelium growth stage enhanced the sporulation as compared with light incubation, and the amount of sporulation at a photoperiod of 24 h darkness incubation was more than 2 times as high as that at a photoperiod of 24 h light incubation; that the weight of medium poured into plates influenced the sporulation, and the more weight, and the greater amount of sporulation. The current technique increases amount of sporulation

收稿日期: 2011-04-19 修回日期: 2011-06-08

基金项目: 澳大利亚联邦科学院 - PI-021(2006~2010)

作者简介: 李湘民(1963—),男,研究员,博士,主要从事作物真菌病害研究, E-mail: xmli1025@yahoo.com.cn.

of FPCS3096 20-50 times as compared with the previous technique in the laboratory , i. e. incubating the pathogen on PDA plate , then lighting the plate.

Key words: *Fusarium pseudograminearum*(FPCS3096) ; vegetative growth stage; dark incubation; sporulation

在澳大利亚 *Fusarium pseudograminearum*(以前为 *Fusarium graminearum* Group 1 ,有性世代 *Gibberella zeae* (Schwein.) Petch)^[1] ,引起两种重要的小麦病害 ,即小麦赤霉病和小麦冠腐病(Crown rot)^[2] ,赤霉病是病菌在小麦穗期多雨高湿的气候下侵入穗部引起发病的 ,而冠腐病是病原菌主要在苗期从根冠及邻近区域侵入 ,起初在薄壁组织定殖 ,后期扩展到维管束的一种病害^[3] ,这种病害在穗期干旱的条件下引起小麦白穗 ,对产量构成严重的威胁 ,特别是近几年来 ,澳大利亚干旱严重 ,冠腐病对小麦生产构成了严重的威胁 ,成为小麦生产上最严重的病害。为了有效地防治小麦冠腐病 ,科学家们开展了小麦抗冠腐病抗源的挖掘与利用研究 ,他们首先进行了抗性鉴定方法的探讨^[4-9] ,Li 等^[10] 建立了一种简便、快速、高效的冠腐病抗性鉴定方法。在人工接种中 ,一个基本的前提是确保有足够量的接种体 ,即需要大量的大型分生孢子 ,他们现有的做法是将病菌接种在 PDA 上培养 6~7 d ,刮去表面菌丝后在荧光灯下光暗交替培养 5~7 d ,然后收获孢子。试验中笔者发现 ,这种方法产孢量并不大 ,为了达到接种需要的浓度(孢子 1×10^6 /mL) ,不得不进行离心浓缩处理 ,并要制备大量的培养基 ,同时消耗大量的一次性培养皿。为此 ,笔者以菌株 *Fusarium pseudograminearum* (FPCS3096) 为材料 ,开展了该菌株产孢条件的研究 ,获得较好的结果 ,现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 供试菌株

小麦冠腐病的强致病性菌株 *Fusarium Pseudograminearum*(FPCS3096) 由 CSIRO Plant Industry 提供。

1.2 培养基筛选试验

1.2.1 培养基的种类 根据营养成分及不同的比例 ,选择 6 种培养基 ,分别是: 1. 2.5% 绿豆汤固体培养基(MBA) ; 2. 5% MBA ; 3. 10% MBA ; 4. PDA(马铃薯 200 g ,葡萄糖 20 g ,琼脂 20 g) ; 5. 1/2 PDA(马铃薯 100 g ,葡萄糖 10 g ,琼脂 20 g) ; 6. 1/4 PDA(马铃薯 50 g ,葡萄糖 5 g ,琼脂 20 g) 。绿豆汤汁的配制是将不同比例的绿豆汤汁在微波炉加热 9 min ,一个要点是不能让绿豆爆开 ,然后将绿豆倒掉 ,取其汤汁。

1.2.2 接种、培养与产孢 将 1 块直径为 7 mm 的长满 FPCS3096 菌丝的 PDA 琼脂块接入上述各培养基中 ,28 ℃ 下培养 7 d 后 ,用灭菌的玻片刮去表面的菌丝 ,然后 ,放入产孢柜中 ,在荧光灯下光暗交替 12 h 光照 ,直至试验结束。

1.3 营养生长阶段光周期对产孢的影响

试验设 3 个处理: 1. 24 h 暗培养; 2. 光暗各 12 h 培养; 3. 24 h 光培养。暗培养的做法是将一组 5 个接入 7 mm 菌丝块的 1/2PDA 培养皿用双层的金属箔纸包埋。所有处理的培养皿放入光照培养箱中(光照为 40 W 的日光灯) 28 ℃ 下培养 7 d ,产孢过程同 1.2.2。

1.4 营养生长阶段不同培养时间对产孢的影响

试验设 4 个处理: 1. 培养 6 d ; 2. 培养 8 d ; 3. 培养 10 d ; 4. 培养 12 d 。具体的做法是采用时间差 ,使以上处理的培养皿在刮去表面菌丝后 ,同一时间放入产孢柜中 ,产孢过程同 1.2.2。

1.5 产孢阶段不同光源对产孢的影响

试验设 4 个处理 ,1. 无光照(暗处理) ; 2. 12 h 光暗交替; 3. 24 h 光照; 4. 12 h 萤光、暗交替。暗处理的做法同 1.3。将接菌的平板培养 12 d 后 ,刮去表面菌丝再按照以上处理。以上所有试验处理均采用 5 个重复。

1.6 不同重量的培养基对产孢的影响

在培养皿中倒入不同量的培养基 ,然后称重 ,去除培养皿的重量 15.00 g ,即得到倒入培养基的重量 ,接种培养 12 d ,产孢过程同 1.2.2。

1.7 孢子计数

试验 1.2—1.5 采用相同的方法 ,即在产孢的第 3 ,5 ,7 ,9 天 ,计数各培养皿的孢子数。具体做法是

将每1培养皿4等分,每次随机取1等分观察。将1等分的培养基加入2 mL水,将孢子洗下后,在显微镜下观察,记数显微计数器中4个方格内的孢子数,并按公式:

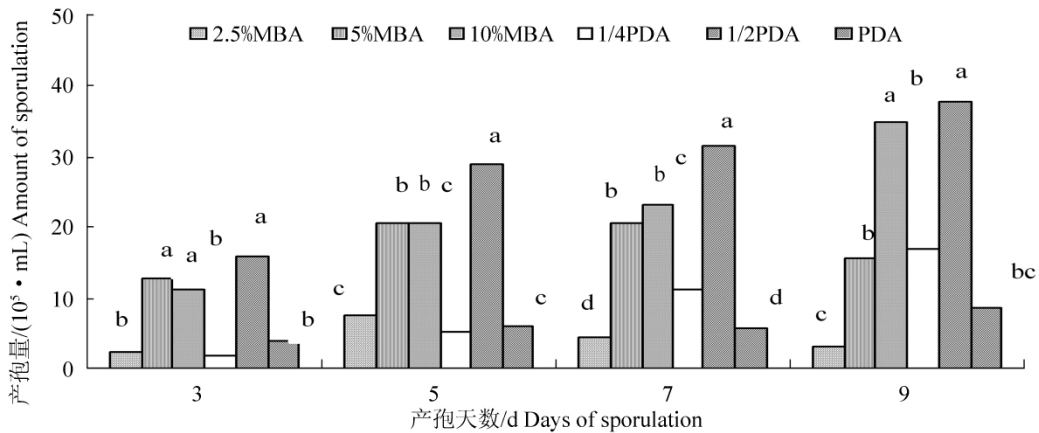
$$\text{孢子数/mL} = 4 \text{ 个方格内孢子数} / 4 \times 250 \times 1\,000 \tag{1}$$

为减少误差,每个培养皿取4个观察值,即总共观察16个方格。

试验1.6采用类似的方法,在产孢的第3,7天各观察1次,将每1培养皿2等分,每次随机取1等分观察。将1等分的培养基加入4 mL水,其余同前。

1.8 数据分析

应用DPS3.01专业版数据分析软件,采用新复极差法对平均数进行比较。



数据为5个重复的平均值。同一列相同的字母表示经新复极差法($P=0.05$)测验,平均数没有显著性差异。

Each datum is a mean of 5 replications, means with the same letter are not significantly difference at $P=0.05$ by Duncan's multiple range test.

图1 不同培养基对菌株FPCS3096产孢数量的影响

Fig. 1 The influence of different media on sporulation of pathogen FPCS3096

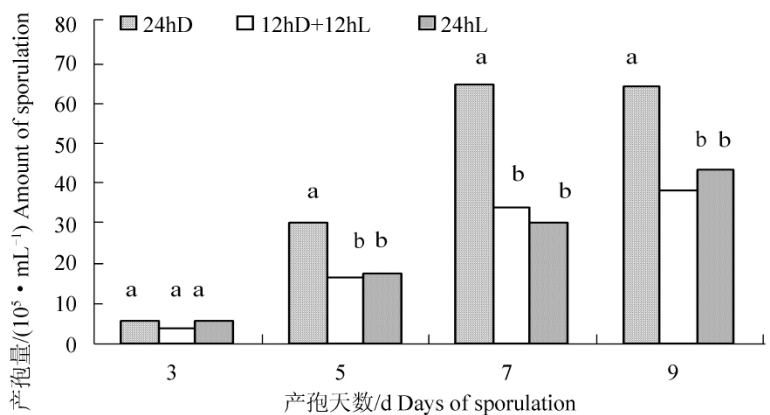
2 结果

2.1 不同培养基中FPCS3096的产孢数量

图1表明,不同培养基的产孢数量有很大差异,在6种培养基中,在4次观察中,2.5% MBA产孢数量总最少,而1/2PDA产孢数量总最多,如在第7天,两者的产孢数量分别为孢子 $4.43 \times 10^5/\text{mL}$ 和 $3.14 \times 10^6/\text{mL}$,相差7倍多。

2.2 营养生长阶段光周期对产孢的影响

图2表明,菌丝生长阶段不同的光周期对产孢有显著的影响,如在第7天,24 h暗培养的产孢数显著地高于光暗各12 h培养和24 h光培养的产孢数,三者的数量分别为 $6.47 \times 10^6/\text{mL}$, $3.38 \times 10^6/\text{mL}$, $3.01 \times 10^6/\text{mL}$, 24 h暗培养的产孢数是24 h光培养的产孢数的2.15倍,但光暗各12 h培养和24 h光培养的产孢数没有显著性差异。



数据为5个重复的平均值。同一列相同的字母表示经新复极差法($P=0.05$)测验,平均数没有显著性差异。

Each datum is a mean of 5 replications, means with the same letter are not significantly difference at $P=0.05$ by Duncan's multiple range test.

图2 营养生长阶段不同光周期对产孢的影响

Fig. 2 The influence of different photoperiods during vegetative growth stage on sporulation of pathogen FPCS3096

2.3 菌丝生长阶段不同培养时间对产孢的影响

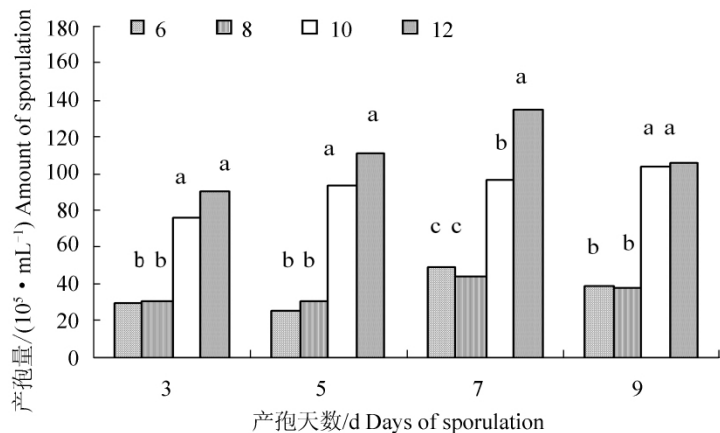
图3可看出,在光照第5天,培养6,8,10,12 d的产孢量分别为 2.53×10^6 /mL, 3.09×10^6 /mL, 9.39×10^6 /mL, 1.12×10^7 /mL, 培养12 d的产孢量是培养6 d产孢量的4.43倍,这表明不同培养时间对产孢有显著的影响。

2.4 产孢阶段不同光源对产孢的影响

图4表明不同光源对产孢量有显著的影响,以12 h 萤光、暗交替的产孢数量最多。如第7天,无光照、12 h 光暗交替、24 h 光照和12 h 萤光、暗交替的产孢数分别为 2.33×10^6 /mL, 8.52×10^6 /mL, 9.32×10^6 /mL 和 1.13×10^7 /mL。

2.5 培养皿内不同重量的培养基对产孢的影响

试验结果见表1,从表1可看出,不同重量的培养基对产孢量有很大的影响,总的趋势是培养基的重量越重,产孢量越大。如当培养基的重量为34.32 g时,光照3 d和7 d的产孢量分别为 10.19×10^6 /mL 和 12.03×10^6 /mL,当培养基的重量为14.26 g时,光照3天和7天的产孢量分别为 1.0×10^6 /mL 和 1.63×10^6 /mL,前者培养基的重量是后者的2.38倍,但前者产孢量分别是后者的10.19倍和7.38倍。根据这一结果,以1 L培养基铺30个左右平板可获得最大产孢量。



数据为5个重复的平均值。同一列相同的字母表示经新复极差法($P = 0.05$) 测验,平均数没有显著性差异。

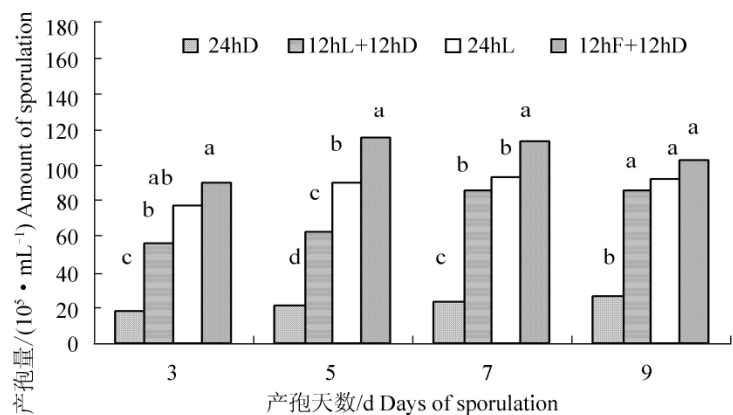
Each datum is a mean of 5 replications, means with the same letter are not significantly difference at $P = 0.05$ by Duncan's multiple range test.

图3 营养生长阶段不同培养时间对产孢的影响

Fig. 3 The influence of different incubation times during vegetative growth stage on sporulation of FPCS3096

3 讨论

有关真菌产孢条件的研究,主要涉及培养基的种类和成分(包括利用寄主植物组织的汁液)^[11-13]、理化性状(固体、液体培养基)^[14]、温度和光照等^[15]。但本试验中仍有一些新的发现。首先是真菌培养时间对产孢的影响,笔者在一次偶然中发现在菌丝长满平板后,继续培养促进了产孢,为了进一步证实,笔者设计了不同培养时间的试验,结果表明培养12 d的产孢量比培养6 d提高了3~4倍。而国内在稻瘟病菌产孢过程中,普遍的做法是在菌丝未长满平板(通常是长到70%~80%的平板时),就刮去菌丝^[16],然后立即光照。其次,在营养生长阶段,暗处理促进了后期的产孢。而现有的理论认为,光照对产孢的影响是在孢子形成阶段^[12],所以有了在菌丝长满平板后,刮去或不刮去菌丝,采用光照促进产孢的方法。第三,培养皿内培养基的重量或厚薄对产孢的影响,表1的结果表明,当重量比相差2倍多时,



数据为5个重复的平均值。同一列相同的字母表示经新复极差法($P = 0.05$) 测验,平均数没有显著性差异。

Each datum is a mean of 5 replications, means with the same letter are not significantly difference at $P = 0.05$ by Duncan's multiple range test.

图4 产孢阶段不同光源对产孢的影响

Fig. 4 The influence of different light sources during sporulation stage on sporulation of pathogen FPCS3096

产孢量最大相差 10 倍多(表 1) 这种差异很可能是某些微量元素促进了产孢。

表 1 培养皿内培养基重量对产孢量的影响

Tab.1 The influence of medium weight each Petri on the amount of sporulation of FPCS3096 10^6 /mL

重量/g Weight	光照 3 d 3 days of light	光照 7 d 7 days of light	重量/g Weight	光照 3 d 3 days of light	光照 7 d 7 days of light
34.32	10.19	12.03	18.75	2.84	4.53
30.33	5.12	8.69	17.50	2.34	4.38
29.25	4.23	8.03	17.29	2.05	3.39
28.01	4.14	6.75	17.21	2.2	3.44
24.99	4.05	7.5	16.90	2.38	3.25
24.13	4.03	7.19	14.26	1.0	1.63
19.39	2.84	4.69			

菌株 *Fusarium pseudograminearum* FPCS3096 产孢的最佳条件是 28 °C 下在 1/2PDA 上培养 12 d(暗培养), 刮去表面菌丝后, 在荧光灯下光暗交替培养 3~7 d, 然后收获孢子, 具体的时间取决于接种试验的进度安排。由于培养基的量对产孢影响很大, 因此我们在以后的接种试验中倒入培养基的量是控制在 1 L 培养基铺 30 个平板, 这样, 产孢量每次都在 1×10^7 /mL 以上。相比, 本实验室以前采用的在 PDA 培养基上培养然后光照产孢, 产孢数量一般是 2×10^5 /mL ~ 5×10^5 /mL, 因此, 现有的技术将产孢量提高了 20~50 倍, 大大地减轻了工作量。

在国内, 笔者曾试用这种方法在稻瘟病菌产孢上, 很遗憾, 培养时间的延长以及暗培养、培养基的重量对产孢均没有显著性影响, 尽管采用了多个菌株, 也采用了刮去菌丝或不刮菌丝等多种方法, 这表明不同真菌产孢的习性有很大的不同。

参考文献:

- [1] Aoki T, O'Donnell K. Morphological and molecular characterization of *Fusarium pseudograminearum* sp nov, formerly recognized as the Group 1 population of *F. graminearum* [J]. *Mycologia*, 1999, 91: 597-609.
- [2] Burgess L W, Klein T A, Bryden W L, et al. Head blight of wheat caused by Group 1 in New South Wales in 1983 [J]. *Australas PI Pathol*, 1987, 16: 72-78.
- [3] Burgess L W, Backhouse D, Summerell B A, et al. Crown rot of wheat [M]//Summerell B A, Leslie J F, Backhouse D, et al. *Fusarium*. APS Press 2001: 271-294.
- [4] Purss G S. Studies of varietal resistance to crown rot of wheat caused by *Fusarium graminearum* Schw [J]. *Queensland Journal of Agricultural and Animal Sciences*, 1966, 23: 475-598.
- [5] Dodman R L, Wildermuth G B. Inoculation methods for assessing resistance in wheat cultivars to crown rot caused by *Fusarium graminearum* Group1 [J]. *Australian Journal of Agricultural Research*, 1987, 38: 473-486.
- [6] Wallwork H, Butt M, Cheong J P E, et al. Resistance to crown rot in wheat identified through an improved method for screening adult plants [J]. *Australasian Plant Pathology*, 2004, 33: 1-7.
- [7] Wildermuth G B, McNamara R B. Testing wheat seedlings for resistance to crown rot caused by *Fusarium graminearum* group 1 [J]. *Plant Disease*, 1994, 78: 949-954.
- [8] Wildermuth G B, McNamara R B, Quick J S. Crown depth and susceptibility to crown rot in wheat [J]. *Euphytica*, 2001, 122: 397-405.
- [9] Mitter V, Zhang M C, Liu C J, et al. A high-throughput glasshouse bioassay to detect crown rot resistance in wheat germplasm [J]. *Plant Pathology*, 2006, 55: 433-442.
- [10] Li Xiangmin, Liu Chunji, Chakraborty Sukumar, et al. A simple method for the assessment of crown rot disease severity in wheat seedlings inoculated with *Fusarium pseudograminearum* [J]. *J Phytopathology*, 2008, 156: 571-754.
- [11] 冷伟锋, 李保华, 国立耘, 等. 苹果轮纹病菌诱导产孢方法 [J]. *植物病理学报*, 2009, 39(5): 536-539.
- [12] 方中达. 植病研究方法 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [13] 刘永锋, 陈志谊, 胡明, 等. 江苏省稻瘟病菌群体分布及优势小种的毒力研究 [J]. *中国水稻科学*, 2004, 18(4): 351-356.
- [14] 庄义庆, 乔广行, 王源超, 等. 蕉斑镰刀菌 32—6 菌株产孢条件研究 [J]. *南京农业大学学报*, 2008, 31(4): 77-81.
- [15] Leach C M. Ultraviolet-absorbing substances associated with light-induced sporulation in fungi [J]. *Canada Journal Botany*, 1965, 43(2): 185-200.
- [16] 潘庆华, 胡铁柱, 王玲, 等. 稻瘟病菌群体的分子遗传学研究 [J]. *中国农业科学*, 2004, 37(1): 57-64.