

果炭疽病菌微循环产孢的研究*

Microcycle Conidiation of *Colletotrichum gloeosporioides*

岑贞陆 黄思良 晏卫红

Cen Zhenlu Huang Siliang Yian Weihong

(广西农业科学院 南宁市西乡塘西路4号 530007)

(Guangxi Academy of Agricultural Sciences, 44 West Xixiangtanglu, Nanning, Guangxi, 530007, China)

摘要 报道不同培养条件对果炭疽病菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 微循环产孢的影响。该病菌微循环产孢的 pH 值范围为 4.0~10.0, 最适为 6.0。一定浓度的酵母膏液、葡萄糖液有利于其微循环产孢; 黑暗、荧光与黑暗交替、荧光处理等促进微循环产孢, 其中, 以黑暗、荧光与黑暗交替处理产生的二次分生孢子的平均数最多, 微循环产孢的适宜温度为 20°C~35°C, 最适为 25°C~30°C; 二次分生孢子的大小为 7.4 μm~13.5 μm × 2.6 μm~4.2 μm。

关键词 果炭疽病菌 微循环产孢 培养条件

中图分类号 S 436.67

Abstract The effects of cultivation conditions on microcycle conidiation in *Colletotrichum gloeosporioides*, were studied. The suitable pH values for microcycle conidiation ranged from 4.0 to 10.0, the optimum at 6.0; the favourable temperature was from 20°C to 35°C, and the optimum was from 25°C to 30°C. Yeast extract and glucose in certain concentration could be helpful to microcycle conidiation. Microcycle conidiation was enhanced under treatments of black, and alteration of fluorescence and darkness, and fluorescence. The highest average number of the secondary conidia was obtained under black, and alteration of fluorescence and darkness. The second conidia were 7.4 μm to 13.5 μm long by 2.6 μm to 4.2 μm wide.

Key words *Colletotrichum gloeosporioides*, microcycle conidiation, cultivation conditions

果炭疽病是世界果产区的重要病害,严重影响着果的生产与市场销售^[1~2]。有关果炭疽病菌 [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc.] 的生物学特性,国内外曾有不少报道,但对其微循环产孢现象却所知甚少,果炭疽病菌与不少真菌一样具有微循环产孢特性。微循环产孢是指孢子萌发后不形成菌丝体而从芽管先端直接产生无性孢子的真菌的一种生殖方式。Lingappa^[3]报道在实验室条件下,刺盘孢属的分生孢子密度过大,繁殖被抑制时可形成二次分生孢子。在黑曲霉、青霉、面包脉纹孢菌等真菌中,已证实微循环产孢是研究中的有用工具^[4]。为了深入了解果炭疽病的发生流行规律及病原菌分生孢子的侵染机制,作者对果炭疽病菌微循环产孢现象进行了若干研究,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

菌种从广西大学农学院园艺站紫花病叶组织分离,经单孢纯化后备用。

1.2 二次分生孢子大小的测量

用肉汁胨培养基(蛋白胨 5 g, 酵母膏 1 g, 牛肉膏 3 g, 蔗糖 10 g, 琼脂 17 g, 水 1000 ml) 培养供试果炭疽病菌 10 d~15 d, 调制含 0.5% 葡萄糖的分生孢子悬浮液(10⁷ 个孢子/ml, pH 值=6), 用喷雾器将分生孢子悬浮液均匀喷在贴有单层玻璃纸的载玻片上(以玻璃纸恰好湿润为准), 并将载玻片置于(27±1)°C 下保湿培养 48 h~60 h 后进行显微镜拍照, 照片经放大后用游标卡尺测量 100 个二次分生孢子的大小, 取其平均值。

1.3 pH 值对微循环产孢的影响试验

用肉汁胨培养基培养供试果炭疽病菌 10 d~15 d, 调制 pH 值分别为 2 4 6 8 10 12 的 0.5% 葡萄糖液, 并用这些葡萄糖液来配制分生孢子悬浮液

2000-02-28 收稿, 2000-05-09 修回。

* 广西回国留学人员科学基金(桂科回 9618001)、广西“十百千人才工程”专项资金资助(桂人函(1998)354号)

(10^7 个孢子/ml) 将不同 pH 值的孢子悬浮液均匀喷雾到贴有单层玻璃纸的载玻片上, 置于 (27 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 下保湿培养 36 h, 48 h 后镜检微循环产孢率。每处理重复 3 次。

1.4 营养液对微循环产孢的影响试验

先配制好葡萄糖液 (0.5% 葡萄糖水溶液)、蔗糖液 (0.5% 蔗糖水溶液)、蛋白胨液 (0.5% 蛋白胨水溶液)、酵母膏液 (0.5% 酵母膏水溶液)、牛肉膏液 (0.5% 牛肉膏水溶液)、苹果液 (10% 苹果幼嫩枝叶组织磨碎后于水浸 24 h 的浸渍液) 将各营养液配成浓度为 10^7 个孢子/ml 的孢子悬浮液 (pH 值 = 6), 并将孢子悬浮液喷雾在贴有单层玻璃纸的载玻片上, 在 (27 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 下培养 36 h, 48 h 后镜检微循环产孢率。每处理重复 3 次。

1.5 温度对微循环产孢的影响试验

用 0.5% 葡萄糖液配制浓度为 10^7 个孢子/ml 的孢子悬浮液, 调节其 pH 值为 6, 将孢子悬浮液均匀喷雾在贴有单层玻璃纸的载玻片上, 然后分别置于 5 $^{\circ}\text{C}$ 、10 $^{\circ}\text{C}$ 、15 $^{\circ}\text{C}$ 、20 $^{\circ}\text{C}$ 、25 $^{\circ}\text{C}$ 、30 $^{\circ}\text{C}$ 、35 $^{\circ}\text{C}$ 、40 $^{\circ}\text{C}$ 、45 $^{\circ}\text{C}$ 梯度温度下保湿培养 36 h, 48 h 后镜检微循环产孢率。每处理重复 3 次。

1.6 光环境对微循环产孢的影响试验

将 0.5% 葡萄糖液配制成浓度为 10^7 个孢子/ml 的孢子悬浮液, 调节其 pH 值为 6 将孢子悬浮液均匀喷雾到贴有单层玻璃纸的载玻片上, 然后分别置于红光、蓝光、青光、黑光、荧光、荧光黑暗各 12 h 交替、黑暗共 7 种不同光环境中 (27 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 下保湿培养。培养 36 h, 48 h 后分别镜检微循环产孢率。每处理重复 3 次。

上述 1.3~ 1.6 中每个处理的各个重复所观测的平均分生孢子数为 105 ± 24 个。

2 结果与分析

2.1 二次分生孢子的形态与大小

苹果炭疽病菌微循环产孢状如图 1 所示。分子孢子萌发后, 大多数孢子于其中部产生分隔, 有时两端均可形成芽管, 通常是较长的芽管末端长附着胞, 附着胞黑褐色, 不定形; 而较短的另一条芽管则分化成分生孢子梗, 分生孢子梗的末端处渐细, 并在其上产生单个二次分生孢子, 偶尔也产生两个二次分生孢子。二次分生孢子形态与原分生孢子相似, 椭圆形, 两端圆钝, 单胞, 无色, 大小为 ($7.4 \sim 13.5$) $\mu\text{m} \times$ ($2.6 \sim 4.2$) μm , 与本菌分生孢子大小的文献报道值 ($10.2 \sim 15.8$) $\mu\text{m} \times$ ($4.0 \sim 4.5$) μm ^[5] 或 ($9 \sim 24$) $\mu\text{m} \times$ ($3 \sim 4.5$) μm ^[6] 相比, 二次分生孢子略小于原分生

孢子。二次分生孢子容易从分生孢子梗上脱落, 从而也证实了二次分生孢子并非为黑化前的附着胞, 也不是芽管融合中的分子孢子。

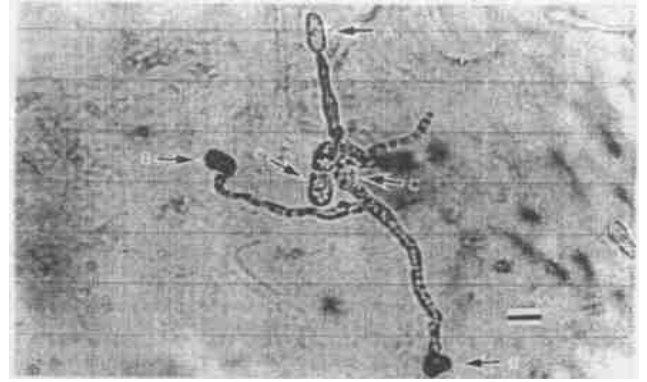


图 1 苹果炭疽病菌分生孢子微循环产孢 (尺标 = $10^4 \mu\text{m}$)

Fig. 1 Microcycle conidiation in *C. gloeosporioides*

(Scale $10^4 \mu\text{m}$)

A: 二次分生孢子 A secondary conidium; B 附着胞 Appressoria; C 发芽分生孢子 Germinating conidia.

2.2 pH 值对微循环产孢的影响

分生孢子发芽液在 pH 值 4~ 10 之间均可观察到苹果炭疽病菌微循环产孢现象 (图 2), 在 pH 值为 6 的处理区中, 分生孢子出现微循环产孢率, 以及产生二次分生孢子的平均数均达到最高峰。该结果表明偏酸性环境有利于苹果炭疽病菌微循环产孢。

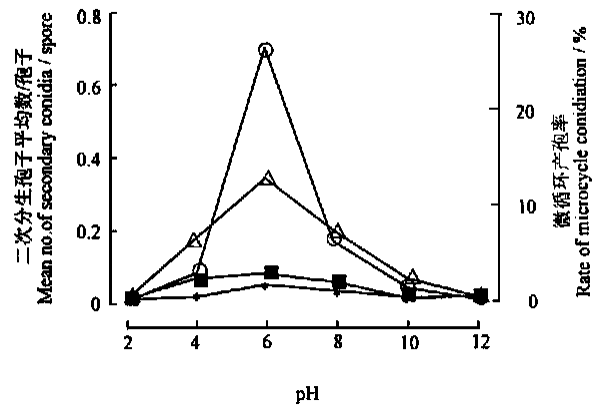


图 2 pH 值对微循环产孢的影响

Fig. 2 Effects of pH values on microcycle conidiation in *C. gloeosporioides*

-*-* -: 培养 36 h 后的微循环产孢率 Rate of microcycle conidiation after 36 h of incubation;

-○-○ -: 培养 48 h 后的微循环产孢率 Rate of microcycle conidiation after 48 h of incubation;

-■-■ -: 培养 36 h 后平均每孢子产生二次分生孢子数 Average number of secondary conidia from a spore after 36 h of incubation;

-△-△ -: 培养 48 h 后平均每孢子产生二次分生孢子数 Average number of secondary conidia from a spore after 48 h incubation.

2.3 营养对微循环产孢的影响

分生孢子在各营养液中培养 24 h 后, 在酵母膏液处理区中首先观察到微循环产孢现象。培养 36 h

与 48 h 后的结果如表 1 所示, 酵母膏液和葡萄糖液两个处理区在培养 36 h 与 48 h 后的微循环产孢率均最高, 且两处理区出现微循环产孢的时间均早于其他处理区。该结果表明一定浓度的酵母膏液与葡萄糖液利于本菌微循环产孢。

表 1 营养液对芒果炭疽病菌微循环产孢的影响

Table 1 Effects of nutrient fluids on microcycle conidiation in *C. gloeosporioides*

营养液 Nutrient fluid	微循环产孢率 Rate of microcycle conidiation (%)		二次分生孢子数 No. of secondary conidia*	
	36 h	48 h	36 h	48 h
葡萄糖液 Glucose fluid	0.6a	4.06a	0.01a	0.21a
蔗糖液 Sucrose fluid	0a	0.64bc	0a	0.03b
酵母膏液 Yeast extract	1.36a	3.11ab	0.02a	0.09ab
牛肉膏液 Beef extract	0a	1.45abc	0a	0.05b
芒果液 Mango fluid	0a	1.50abc	0a	0.03b
蛋白胨液 Peptone	0a	0c	0a	0c
蒸馏水 (CK) Distilled water	0a	0.31c	0a	0.01b

* 平均每一孢子产生的二次分生孢子数。Average number of secondary conidia from a spore.

2.4 温度对微循环产孢的影响

温度对芒果炭疽病菌微循环产孢的影响如图 3 所示。在 20℃~ 35℃ 范围内均可观察到微循环产孢, 微

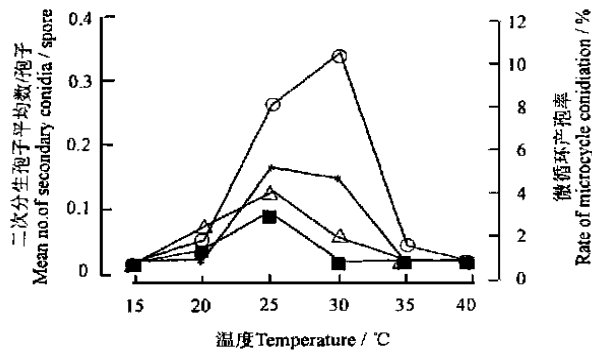


图 3 温度对微循环产孢的影响

Fig. 3 Effect of temperature on microcycle conidiation in *C. gloeosporioides*

-○-○-: 培养 36 h 后的微循环产孢率 Rate of microcycle conidiation after 36 h of incubation;
-□-□-: 培养 48 h 后的微循环产孢率 Rate of microcycle conidiation after 48 h of incubation;
-■-■-: 培养 36 h 后平均每一孢子产生二次分生孢子数 Average number of secondary conidia from a spore after 36 h of incubation;
-△-△-: 培养 48 h 后平均每一孢子产生二次分生孢子数 Average number of secondary conidia from a spore after 48 h incubation.

循环产孢的最适温度较窄, 处于 25℃~ 30℃ 之间, 30℃ 下培养 48 h 后, 初生分生孢子微循环产孢率达到最高峰, 随着温度升高, 初生分生孢子微循环产孢率陡降。

2.5 光环境对分生孢子微循环产孢的影响

不同光环境处理中, 在黑暗、红光、蓝光 3 个处理区能较早地观察到微循环产孢, 培养 48 h 后, 以黑暗、荧光与黑暗交替处理区的微循环产孢率最高, 红光处理区次之, 青光处理区最低 (表 2)。红光与荧光处理区产生二次分生孢子的平均数最多, 黑暗与蓝光处理区次之, 青光处理区的孢子虽正常萌发, 但观察不到微循环产孢 (表 2)。该结果表明光环境对微循环产孢的快慢以及二次分生孢子的产生量有显著影响。

表 2 光环境对微循环产孢的影响
Table 2 Effects of light on microcycle conidiation in *C. gloeosporioides*

光环境 Light	微循环产孢率 Rate of microcycle conidiation (%)		二次分生孢子数 No. of secondary conidia*	
	36 h	48 h	36 h	48 h
红光 Red	7.69ab	10.58ab	0.07ab	0.34a
蓝光 Blue	1.64ab	7.56b	0.12ab	0.28a
青光 Green	0b	0c	0b	0c
黑光 Black	0b	0.41c	0b	0.05b
荧光 Fluorescence	0b	7.93b	0b	0.35a
荧光、黑暗交替 Alternation of fluorescence and darkness	0b	14.03ab	0b	0.18a
黑暗 Darkness	9.70a	16.06a	0.15a	0.24a

* 平均每一孢子产生的二次分生孢子数。Average number of secondary conidia from a spore.

3 讨论

酵母膏营养液、黑暗的光环境这两种培养条件对本菌二次分生孢子的形成有促进作用, 这一结果与 Richard^[4]提出的“具分生孢子的某些真菌, 在黑暗酵母液中产生二次分生孢子尤为显著”相符, 也与黄思良等人^[7]发现的含酵母膏的培养基对芒果炭疽病菌的孢子形成具有显著的促进作用相似。

在微循环产孢的快慢及二次分生孢子的产生量上, 营养较为全面的芒果液处理区不如营养较为单一的蔗糖液、葡萄糖液、酵母膏液等处理区的二次分生孢子产生量大。并且, 单糖的葡萄糖液处理区在二次分生孢子产生量上也高于双糖的蔗糖液处理区。我们认为本菌微循环产孢的快慢以及二次分生孢子的产生量易受营养因素的影响。

(下转第 234 页 Continue on page 234)

2.2.2 试验结果

水稻生长情况和试验结果见表5从表5可见,施用有机复合肥的小区明显好于对照小区 ($P < 0.05$),与施用三元复合肥的小区无明显区别 ($P > 0.05$);各区组间没有显著性差异 ($P > 0.05$),说明该试验田土壤肥力均匀一致,试验田符合设计要求;施用有机复合肥与不施用相比有明显增产效果,增产幅度达12.8%,而与三元肥相比没有表现出明显的差异,但有接近一个百分点的增产幅度。

3 讨论

从本次试验可以看出将城市污泥加工成有机复合肥在技术上是可行的。肥料的效果与目前广泛使用的复合肥相当。由城市污水污泥制有机复合肥原料充足,可就地取材,成本低廉,经济合理,具有一定的市场竞争力。

污泥有机复合肥不仅能向土壤提供一定量的N、P、K等养分和多种微量元素,提高土壤有机质含量,调整土壤酸碱度,而且能够通过改良土壤团粒结构、孔隙度、容重来改善农作物生长发育的条件^[7]。在生产污泥肥过程中,污泥中的碳水化合物和含氮化合物,在高温好氧条件下,经好氧微生物作用发生了矿质化和腐殖化过程,释放出农作物所需的多种养分,同时部分有机质重新组合成腐殖质^[8]。这是增强土壤

肥力及农作物增产的主要原因

将城市污水污泥制成复合肥料,较好地解决了城市污水污泥的出路问题,适合我国国情,对于合理利用污泥资源,减少环境污染,具有十分重要的意义。

致谢

本文在完成过程中得到桂林市农业科学研究所的大力支持,在此表示衷心感谢。

参考文献

- 1 戴维撕 R D. 污泥农用的回顾. 国外农业环境保护, 1991, (1): 34~36.
- 2 宋敬阳. 城市污水污泥的农田施用. 国外环境科学技术, 1993, (3): 29~32.
- 3 何笃光,倪艳芳. 城市固体废弃物混合肥料的化学特性. 国外环境科学技术, 1993, (4): 30~35.
- 4 杨琦,刘广生,钱易. 污泥处理和处置技术新进展. 上海环境科学, 1999, (3): 133~138.
- 5 周少奇. 有机垃圾好氧堆肥法的生化反应机理. 环境保护, 1999, (3): 30~32.
- 6 曲颂华,陈绍伟. 城市垃圾与污水厂污泥的混合堆肥研究. 环境保护, 1998, 10: 15~16.
- 7 钟羨云. 从改善土壤物理现状看城市垃圾. 农业环境保护, 1988, 7(6): 21~24.
- 8 陈世和. 城市生活垃圾堆肥化处理. 环境污染与防治, 1985, 7(4): 29~34.

(责任编辑: 邓大玉)

(上接第22页 Continue from page 227)

在自然界中,许多真菌有微循环产孢现象,本实验证明 $\text{Fusarium$ 炭疽病菌也不例外。在微循环产孢过程中, $\text{Fusarium$ 炭疽病菌的分生孢子不仅可以直接产生分生孢子梗,并在其上产生二次分生孢子,而且还可同时产生具有附着胞的芽管(图1),使侵染过程与侵染源(二次分生孢子)的形成同步进行,这有利于加速其传播及抢占营养源的速度。因此,我们认为微循环产孢现象有利该菌个体间的生存竞争。

本研究没有发现二次分生孢子再次微循环产孢,二次分生孢子能否再次微循环产孢以及二次分生孢子以何种方式侵染入寄主组织内,尚有待进一步探讨。

参考文献

- 1 刘秀娟. 海南 $\text{Fusarium$ 果实真菌潜伏侵染的研究. 植物病理学

报, 1986, 16(1): 47~51.

- 2 王壁生,丁爱冬,刘朝祯等. $\text{Fusarium$ 炭疽病防治试验初报. 广东农业科学, 1993, 2: 38~39.
- 3 Lingappa B T, Lingappa Y. Role of auto-inhibitors on mycelial growth and dimorphism of *Glomerella cingulata*. J Gen Microbiol, 1969, 56: 35~45. pl. 1~2.
- 4 Richard T H. Microcycle conidiation: a review. Mycoscience, 1994, 35: 113~123.
- 5 中国农业科学院植物保护研究所. 中国农作物病虫害. 下册. 第2版. 北京: 中国农业出版社, 1996. 1143~1145.
- 6 张中义,冷怀琼,张志铭等. 植物病原真菌学. 成都: 四川科技出版社, 1989. 395.
- 7 黄思良,赵艳珠,黄连江等. 不同培养基对 $\text{Fusarium$ 炭疽病菌分生孢子形成的影响. 西南农业学报, 1998, 11(1): 62~66.

(责任编辑: 蒋汉明)