

双曲孢菌 (*Nakataea sigmoidea* Hara) 生物学特性初步研究

Biological Characters of *Nakataea sigmoidea* Hara

吴海燕 辛惠普*

Wu Haiyan Xin HuiPu

(沈阳农业大学植物保护学院 辽宁沈阳 110161)

(College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning, 110161, China)

摘要 为了研究双曲孢菌 (*Nakataea sigmoidea* Hara) 在不同环境及营养条件下的产孢特性, 分别在黑暗条件和光照条件下, 通过改变环境因子 (pH值、温度、固体培养、液体培养) 和营养因子 (碳源、氮源、天然、合成) 来进行产孢培养试验。结果表明, 双曲孢菌在黑暗条件下, 不同环境因子和不同营养因子下均不能产生分生孢子; 在自然光条件下, 1.5% 水琼脂、Czapek 培养基上, 菌核和菌丝均能产孢。碳氮比对菌核萌发产生分生孢子有显著影响 ($P < 0.01$), 以碳氮比为 10 时, 产孢率最高, 达 54.23%。紫外灯照射 10 min 可刺激双曲孢菌产孢。

关键词 双曲孢菌 分生孢子 生物学特性

中图分类号 S435.111.46

Abstract The experiment of conidia production are conducted in the conditions of natural light and dark in order to research into the growth behaviour of conidia of *Nakataea sigmoidea* Hara. The facts of pH value, temperature, substrates (liquid and solid), C source, N source, inartificial and composite nutriment are considered. In the darkness, *N. sigmoidea* Hara could not produce conidia in any surroundings or substrates. In the nature light, sclerotia and mycelium could produce conidia in the substrates of 1.5% water agar and Czapek. The ratio of C/N has significant effect on the production of conidia from sclerotia ($P < 0.01$). The production rate of conidia gets to the highest (54.23%) when the ratio of C/N is 10:1. Ten minutes of ultraviolet treatment could stimulate the production of conidia.

Key words *Nakataea sigmoidea* Hara, conidium, biological character

水稻小球菌核病是典型的土传病害。近年来, 由于我国水稻产区大面积连年种植水稻, 年以上稻田均不同程度发生水稻小球菌核病^[1]。发病水稻一般减产 20%~30%, 严重的 50% 以上, 甚至全田倒伏, 产量受到严重影响。有关该病原菌双曲孢菌 (*Nakataea sigmoidea* Hara) 的生物学特性未见有系统的研究报告。本文研究双曲孢菌在不同环境及营养条件下的产孢特性, 为研究水稻小球菌核病的发病规律及防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

菌丝: 分离自黑龙江省农垦科学院水稻研究所提

供的病株, 纯化培养 72 h, 切取菌丝前端

菌核: 将上述菌丝接种到新鲜稻秆培养基上, 在 28℃ 下培养 1 个月左右, 用自来水将菌核冲洗下来, 滤纸过滤, 自然干燥备用。

1.2 试验方法

1.2.1 菌核消毒及分生孢子调查

菌核消毒参考方中达^[2]的方法进行。

菌丝体产生分生孢子: 将培养皿置于显微镜下观察, 每皿取 20 个以上视野 (10×10), 记录每视野的分生孢子数, 然后取平均数, 以减少该病原菌产孢量较少, 分生孢子量较大而产生的误差。

菌核萌发直接产生分生孢子: 显微镜下调查菌核产生分生孢子的情况, 计算产孢菌核占调查菌核总数的百分率。

1.2.2 环境因子对病原菌菌丝产孢的影响

环境因子包括: 温度、光照 (25 W 日光灯)、通气条件、酸碱度。试验方法见文献 [3]

2001-12-17 收稿, 2003-02-20 修回。

* 黑龙江八一农垦大学植物科技学院 黑龙江密山 158308
(College of Plant Technology, Heilongjiang August First Reclamation
Land University, Mishan, Heilongjiang, 158308, China)

1.2.3 碳源、氮源、天然固体培养基、合成液体培养基对病原菌产孢的影响

供试碳源、氮源、天然固体培养基、合成液体培养基及试验方法参考文献 [4]

1.2.4 病原菌菌核产孢试验

温度: 将消毒的菌核转入 PDA 平板上, 每皿 50 粒左右, 每处理 3 皿, 分别置于 10°C、15°C、20°C、25°C、30°C、35°C 的培养箱中培养, 2 d 后显微镜下调查菌核产孢情况

光照: 试验分 3 个处理, 全光照、光暗交替 (光照: 黑暗 = 12 h: 12 h)、全黑暗。消毒方法和培养基同上。只是将各处理同时置于日光灯 (25 W) 下, 全黑暗处理置于暗袋内, 光暗交替人工控制, 2 d 后显微镜下调查产孢情况。

自然光照: 将菌丝及消毒的菌核置于 1.5% 水琼脂平板中, 菌核每皿接种 50 粒, 菌丝每皿接种 5 小块, 每处理 3 皿, 分别置于暗箱中和自然光下培养, 定期在显微镜下观察产孢情况

1.2.5 碳氮比对产孢的影响

试验共设 7 个处理, 即以 Czapek 培养基为基本培养基, 通过蔗糖和 NaNO_3 不同数量的搭配使碳氮比为 80:1、60:1、40:1、30:1、20:1、10:1、5:1 的 7 个系列梯度^[5]。湿热灭菌后备用。将消毒的菌核转入不同碳氮比培养基平板上, 每皿 50 粒左右, 每处理 3 皿, 室内自然光下培养, 1 周后显微镜下检查萌发情况

1.2.6 菌核在不同基质上萌发及产孢情况

将消毒的菌核分别转入 PDA 平板、1.5% 的水琼脂平板、0.05% 的葡萄糖溶液和蒸馏水中, 每处理为 3 皿, 每皿 50 粒菌核, 分别置于自然光下和黑暗培养箱中 (均为 25°C), 4 d 后调查菌核萌发及产孢结果。

1.2.7 紫外线处理对病原菌产孢的影响

用新鲜菌丝块接种于 1.5% 水琼脂平板中, 每皿 5 小块, 置于自然光下培养 2 d 后, 紫外光下分别照射 10 min、20 min、30 min、40 min、50 min, 每处理 2 皿, 同时设对照 (不用紫外线处理即 0 min), 然后继续培养, 1 周后在显微镜下 (10×) 调查产孢情况, 每处理调查 10 个视野, 然后取平均值

1.2.8 统计方法

本试验统计方法为新复极差法 (SSR), 小写字母为 5% 差异水平, 大写字母为 1% 差异显著水平。

2 结果与分析

2.1 黑暗条件的产孢试验结果

在黑暗的培养箱中, 病原菌菌丝在 5~35°C、振荡培养通气条件、pH 值 2.40~12.85 及各种碳源、氮

源、天然培养基上均不产孢 (表 1), 在 25 W 的日光灯下和光 (日光灯) 暗交替的情况下也没有分生孢子产生。

2.2 自然光照对产孢的影响

在自然光照条件下, 菌丝和菌核均产生分生孢子 (图 1), 且菌核直接产生分生孢子梗, 梗上着生分生孢子, 一个菌核可产生十几个分生孢子, 且菌核产孢比率较大, 第 3 天就发现有孢子产生, 第 4 天时分生孢子的数量显著增多, 已有 23.08% 的菌核产孢, 第 5 天有 46.15% 的菌核产孢; 但菌丝体产生的分生孢子梗及分生孢子都很少, 第 3 天没有孢子产生, 第 4 天才零星产生, 以后分生孢子才逐渐增多 (表 1)。从研究结果看, 自然光可刺激水稻小球菌核菌 (*Sclerotium oryzae*) 产生分生孢子双曲孢菌, 且菌核产孢量远大于菌丝产孢量。

2.3 碳氮比对菌核萌发及产孢的影响

表 2 结果表明, 不同碳氮比对菌核萌发有影响, 其中, 80:1、20:1、10:1 处理与其它处理间达到显著性差异, 并以 80:1 的效果最好; 菌核在不同碳氮比培养基上产孢有较大差异, 除 80:1、40:1 和 5:1 间无显著性差异外, 其余各处理间均达显著性差异水平, 碳氮比为 10:1 时, 菌核产孢率为 54.2%, 明显比其它处理的产孢率高, 碳氮比 60:1 时的产孢率最低, 为 18.83%。菌核萌发形成菌丝但不一定产生分生孢子, 说明不是所有的菌核都能萌发产生分生孢子。

2.4 菌核在不同基质中萌发和产孢情况

在自然光照和黑暗条件下, 供试 4 种基质中的菌核均能萌发产生菌丝, 在 PDA 水琼脂中的萌发率均为 100%, 蒸馏水中菌核的萌发率最低, 自然光和黑暗条件下分别为 61.02% 和 57.63%。但菌核萌发产生分生孢子的情况却不同, 在 PDA 0.05% 葡萄糖溶液和蒸馏水中无论是自然光还是黑暗条件下均无分生孢子产生, 1.5% 水琼脂培养基中的菌核只有在自然光照萌发产生孢子, 且第 4 天时有 14.66% 的菌核萌发产孢 (表 3), 说明该菌在满足自然光照条件下, 营养条件也是影响其产孢的必要因素, 营养丰富的培养基上并不一定能产孢。

2.5 紫外光对病原菌产孢的影响

从表 4 可以看出, 该病原菌菌丝在培养 2 d 后, 用紫外光照射 10 min、20 min、30 min、40 min、50 min 后均能继续生长并产孢, 病菌在紫外光处理后其产孢能力有明显差异, 照射 10 min 的菌丝产孢量显

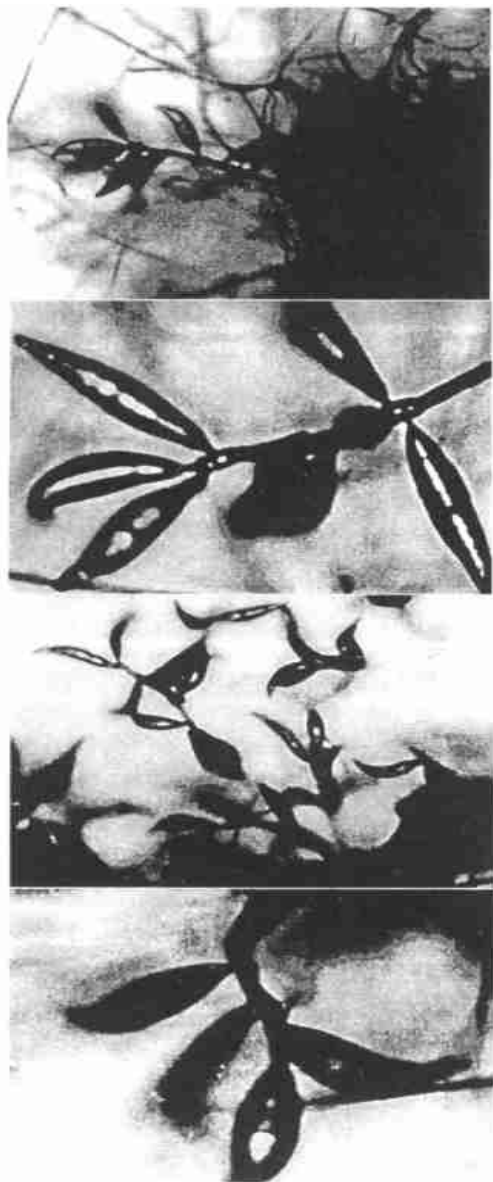


图1 菌核及菌丝体上产生的分生孢子梗和分生孢子

Fig. 1 Conidiophore and conidia produced on sclerotia and mycelium

a. 菌核上产生的分生孢子梗及分生孢子 (64×); b. 分生孢子梗及分生孢子 (100×); c. 菌核上产生的大量分生孢子 (64×); d. 菌丝体上的分生孢子 (100×).

a. Sclerotia produced on conidiophore and conidia (64×); b. Conidiophore and conidia (100×); c. Conidia produced from sclerotia (64×); d. Conidia produced on mycelium (100×). 显著高于其它处理, 平均每视野 35.2 个分生孢子, 比对照多 14.1 个; 其次是照射 20 min 的处理, 平均每视野 25.4 个分生孢子, 比对照多 4.3 个; 其它处理的产孢量显著低于对照. 此研究初步说明, 紫外光照射 10 min 可刺激双曲孢菌产生分生孢子.

3 结束语

(1) 在黑暗条件下, 不同环境因子 (pH 值、温度、固体培养、液体培养), 不同营养 (碳源、氮

表1 菌核及菌丝产生分生孢子的情况

Table 1 The effects of natural light on the production of conidia from sclerotia and mycelium

培养时间 Culture time (d)	菌核产孢率 Production rate of conidia of scleria (%)		菌丝产孢率 Production rate of conidia of mycelium	
	自然光照 Natural light	黑暗 Dark	自然光照 [*] Natural light	黑暗 [*] Dark
	3	0.02 ± 0.01 ^{cd}	0.00	-
4	23.08 ± 1.55 ^c	0.00	+	-
5	46.15 ± 0.94 ^b	0.00	++	-
9	69.23 ± 6.26 ^a	0.00	++	-

* - 不产生分生孢子 No conidium; + 产生分生孢子

Some conidia; ++ 产生较多的分生孢子 More conidia.

表2 不同碳氮比对菌核萌发及产孢的影响结果

Table 2 The effects of Carbon-Nitrogen ratio on sclerotinial germination and conidia production

碳氮比 C/N	菌核数 No. of sclerotia	萌发率 Germination rate (%)	产孢率 Production rate of conidia (%)
80:1	276	99.28 ± 0.63 ^A	26.18 ± 1.46 ^{CD}
60:1	239	92.47 ± 0.52 ^C	18.83 ± 0.33 ^E
40:1	250	98.00 ± 1.04 ^{bcAB}	26.00 ± 0.62 ^{CD}
30:1	283	96.82 ± 0.73 ^B	30.30 ± 0.85 ^{IB}
20:1	250	98.80 ± 0.56 ^{bA}	24.00 ± 1.00 ^{BD}
10:1	260	99.20 ± 0.66 ^{bA}	54.23 ± 1.24 ^A
5:1	303	97.03 ± 0.20 ^B	27.06 ± 0.44 ^C

表3 菌核在不同基质中的萌发和产孢情况

Table 3 Germination and production of conidia of sclerotia in different substrates under natural light and dark

基质 Substrate	自然光照 Natural light		黑暗 Dark	
	萌发率 Germination rate (%)	产孢率 Production rate of conidia (%)	萌发率 Germination rate (%)	产孢率 Production rate of conidia (%)
PDA	100.00	0.00	100.00	0.00
水琼脂 Water agar	100.00	14.66	100.00	0.00
葡萄糖 Glucose solution	97.22	0.00	100.00	0.00
蒸馏水 Distilled water	61.02	0.00	57.63	0.00

表4 紫外光对双曲孢菌产孢的影响

Table 4 The effects of ultraviolet light on the production of conidia

时间 Time (min)	分生孢子数 / 视野 No. of conidia / Field
0	21.1 ± 0.87 ^C
10	35.2 ± 1.50 ^A
20	25.4 ± 0.64 ^B
30	12.6 ± 0.87 ^{BD}
40	10.6 ± 1.01 ^{DE}
50	9.8 ± 0.95 ^E

(下转第 153 页 Continue on page 153)

表 3 马尾松、尾赤桉木材蠕变特性常数

Table 3 Wood creep constants of *P. masoniana* and *E. urophylla* × *camaldulensis*

树种 Species	ϵ_0 / ϵ_b (%)	载荷 P Loading (N)	J_0 ($\times 10^{-7} \text{cm}^2 / \text{N}$)	η_0 ($\times 10^5 \text{N min} / \text{cm}^2$)	$\sum J_i$ ($\times 10^{-7} \text{cm}^2 / \text{N}$)
马尾松 <i>P. masoniana</i>	20	1.5 × 9.8	8.707	1 488 834	1.203
	30	2.5 × 9.8	6.894	619 835	0.454
	40	3.0 × 9.8	6.876	1 032 702	0.378
尾赤桉 <i>E. urophylla</i> × <i>camaldulensis</i>	20	2.5 × 9.8	13.051	609 756	1.126
	30	3.5 × 9.8	10.329	904 977	1.106
	40	4.5 × 9.8	8.086	821 918	2.159

对表 3 的实验结果分析可知:

(1) 对于马尾松木材, 随着载荷的增加, J_0 下降, 抗瞬间弹性变形能力增强, 说明应变的增长滞后于应力的增长。虽然 J_0 虽有起伏, 但总的趋势是下降的, 说明材料随着载荷的增加, 抗长期粘性蠕变能力下降。 $\sum J_i$ 亦呈下降趋势, 说明材料抗延迟弹性蠕变能力增强。

(2) 对于尾赤桉木材, 随着载荷的增加, J_0 下降, 抗瞬间弹性变形能力增强; 应变的增长也滞后于应力的增长。 J_0 亦有起伏, 但总体上仍呈上升趋势, 说明材料随着载荷的增加, 抗长期粘性蠕变能力反而有所增强。 $\sum J_i$ 亦呈上升趋势, 说明材料随载荷的增加, 抗延迟弹性蠕变能力下降。

(3) 马尾松与尾赤桉相比, 载荷相同 (2.5 × 9.8N) 时, 马尾松的抗瞬间弹性变形能力、抗长期粘性蠕变能力、抗延迟弹性蠕变能力均比尾赤桉强。应力水平 σ_0 占极限强度 σ_b 比例相同时, 马尾松的抗瞬间弹性变形能力比尾赤桉强。抗长期粘性蠕变能力及抗延迟弹性蠕变能力总体上亦比尾赤桉强。

3 结束语

关于木材蠕变特性常数化研究, 是木材科学提出

的一个新课题。目前尚无统一的实验标准和评价方法。本文所介绍的用电测法测取木材蠕变特性曲线的实验方法, 虽说比以往常用的“挠度测试法”具有一定的优势, 但未必是最好的方法, 只希望能起到抛砖引玉的作用, 共同推进木材蠕变特性常数化研究的标准化进程。

参考文献

- 刁海林, 梁炳钊, 徐峰等. 木材蠕变特性常数化研究方法探讨. 广西科学, 2002, 9(2): 148~150.
- M. 雷训. 理论流变学讲义. 北京: 科学出版社, 1965. 2.
- 冈小天 [日]. 生物流变学. 北京: 科学出版社, 1980. 11.
- 尹祥础. 固体力学. 北京: 地震出版社, 1985. 6.
- 尹思慈主编. 木材学. 北京: 中国林业出版社, 1996. 10.
- 周光泉, 刘孝敏编著. 粘弹性理论. 合肥: 中国科学技术大学出版社, 1996. 12.
- 天津大学材料力学教研室电测组编著. 电阻应变仪测试技术. 北京: 科学出版社, 1980. 11.

(责任编辑: 黎贞崇 邓大玉)

(上接第 141 页 Continue from page 141)

源), 不同培养基 (天然培养基、合成培养基), 双曲孢菌均不能产生分生孢子。

(2) 在自然光条件下, 1.5% 水琼脂培养基和 Czapek 培养基中, 菌丝体和菌核均能萌发产生分生孢子, 由于实验条件限制而未做光照强度梯度试验, 因此, 产生分生孢子的最佳光照强度还需进一步探索。

(3) 碳氮比对菌核萌发产生分生孢子有一定的影响。碳氮比为 10:1 时菌核产孢比率较大。菌核萌发产生菌丝, 同样情况下不一定产生分生孢子, 其原因有待进一步研究。

(4) 在营养物质缺乏的情况下, 自然光照下利于分生孢子的产生; 少量照射紫外光可刺激病菌产孢。

至于分生孢子产生的最佳培养条件有待进一步研究。

参考文献

- 辛惠普, 范文燕, 郭永霞等. 寒地水稻秆腐病发生规律及防治技术研究. 黑龙江八一农垦大学学报, 2001, 13(4): 8~12.
- 方中达编著. 植病研究法. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- 吴海燕. 水稻小球菌核病原菌生物学特性及侵染规律的研究. 密山: 黑龙江八一农垦大学硕士学位论文集, 2000.
- 吴海燕, 辛惠普. 水稻小球菌核菌无性世代分生孢子双曲孢菌 (*Nakataea sigmoidea*) 的发现及产孢条件研究. 中国水稻科学, 2002, 16(4): 381~384.
- Shinsuke S, Tadao U. Effect of the Carbon/Nitrogen relationship on the microconidial characteristics of *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*. Ann Phytopath Soc, Japan, 1981, 47: 547~554.

(责任编辑: 邓大玉)