

落叶松—杨栅锈菌重寄生菌的生物学特性研究

田爱霞¹, 吴春芳², 梁英梅^{3*}

(1. 甘肃靖远师范学校, 甘肃 靖远 730600; 2. 青海大学 昆仑学院, 青海 西宁 810016;

3. 筑波大学 生命环境研究科, 日本 茨城 305-8572)

摘 要:通过分离培养,发现落叶松—杨栅锈菌(*Melampsora larici-populina*)的重寄生菌主要有 *Cladosporium tenuissimum*、*Alternaria* sp. *Penicillium* sp.。对 *C. tenuissimum* 的生物学特性研究表明,该菌在 PDA 培养基上的生长适温为 25~30℃,在 pH 为 3~11 时均可生长和产孢,最适 pH 为 4~6。在对碳源的利用上,以果糖、葡萄糖生长最好,麦芽糖、淀粉、乳糖、甘露醇、木糖、蔗糖等均可以生长。随着葡萄糖浓度的增加,其菌落直径、菌丝致密程度和产孢量也随之增加。孢子萌发的相对湿度为 90%~100%,在水滴中萌发率最高。分生孢子的致死温度为 45℃,持续时间 10 min。

关键词:落叶松—杨栅锈菌;重寄生菌;生物学特性

中图分类号:S763.11

文献标识码:A

文章编号:1001-7461(2005)04-0108-04

The Biological Characteristics of a Hyperparasite *Melampsora larici-populina*

TIAN Ai-xia¹, WU Chun-fang², LIANG Ying-mei³

(1. Jingyuan Normal School, Jingyuan, Gansu 730600, China; 2. College of Kunlun, Qinghai University, Xi'ning, Qinghai 810016, China;

3. Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan)

Abstract: A hyperparasite fungi of *Melampsora larici-populina* was identified as *Penicillium* sp., *Alternaria* sp. and *Cladosporium tenuissimum* from the uredosori of *Melampsora larici-populina*. The optimum growth temperature for *C. tenuissimum* is 25℃ to 30℃ on PDA medium. The *C. tenuissimum* grows well at pH 3~11, and optimum pH was 4~6. Among 8 carbon sources, fructose and glucose are better than others. The conidia can germinate in relative humidity of 90%~100% but best in the drip of water. Dead temperature of spore is 45℃ for 10 minute.

Key words: *Melampsora larici-populina*; hyperparasite; biological characteristics

早在 20 世纪 70 年代, Omar 等就开始了利用重寄生菌来控制锈病的发生和蔓延的研究^[1]。随着人们对生态安全的重视以及对化学农药防治弊端的认识,促使锈菌重寄生菌的研究工作逐渐开展起来。80 年代以来,国内对落叶松褐锈病(*Triphragmiopsis laricinum*)的重寄生菌进行了系统研究^[2,3]。此后,很多学者对不同锈菌的重寄生菌开展了广泛的研究^[4~8],但国内尚未见相关的报道。

落叶松—杨栅锈菌可侵染青杨派、黑杨派及其杂交的 20 余种杨树,广泛分布于我国东北、华北、西北和西南等地区,是杨树重要的叶部病害之一^[9]。对

落叶松—杨栅锈菌重寄生菌生物学特性的研究,旨在为该锈病的防治提供新的途径。

1 材料与方法

1.1 材料

锈菌(*Melampsora larici-populina*)的夏孢子材料分别于 1998 年 6 月和 2000 年 8 月采自西北农林科技大学火地塘教学实验林场的波氏杨(*Populus purdomii*)上,在解剖镜下从寄主杨树叶片上挑取孢子堆,置于 PDA 培养基上培养,待长出菌丝后移植,获得重寄生菌的纯培养菌株。

收稿日期:2005-04-19

基金项目:国家自然科学基金项目(39970616)

作者简介:田爱霞(1965-),女,甘肃靖远人,讲师。

* 通讯作者:梁英梅(1966-),女,副教授,青海贵德人,主要从事森林病理学和菌物的分子系统学研究。

1.2 试验方法

1.2.1 重寄生菌的分离纯化 取带有自然形成重寄生菌的叶片,剪成5 mm×5 mm的小块,在70%的酒精中浸泡5 s,立即投入0.1%升汞液中浸泡1 min,再用灭菌水冲洗5次后置于PDA平板上培养3~4 d,然后将出现的丝状真菌菌落移植后获得纯培养,备用。

1.2.2 重寄生菌自然寄生率 从叶片上随机挑取夏孢子堆,在光学显微镜下观察重寄生菌的菌丝穿过夏孢子,统计重寄生菌的自然寄生率。

1.2.3 重寄生菌的生物学特性测定

(1)温度对菌丝生长及产孢的影响。在PDA平板培养基上接5 mm的菌饼,分别置于5、10、15、20、25、30、35、40℃下,每个温度为1个处理,每个处理设3个重复,逐日测量菌落直径,直至长满培养皿为止。

(2)不同糖比例对菌丝生长及产孢的影响。配制培养基时,按每1 000 mL加5、10、15、20、25、30 g葡萄糖的比例制成平板,每个糖比例为1个处理,每个处理设3个重复,设无糖处理作为对照,25℃恒温培养,逐日测量菌落直径,至长满培养皿为止。

(3)pH值对菌丝生长及产孢的影响。在无菌条件下,用0.1 mol·L⁻¹ HCl和0.1 mol·L⁻¹ NaOH将PDA培养基的pH值调至2~11,共10个梯度,每皿中央接5 mm的菌饼,每个梯度为1个处理,每处理重复3次,置25℃恒温培养,每24 h测量菌落直径,连续观察4 d。

(4)不同碳源对菌丝生长及产孢的影响。用基础培养基KH₂PO₄ 0.5 g、K₂HPO₄ 0.5 g、MgSO₄·7H₂O 0.5 g、NaCl 0.1 g、CaCl₂ 0.1 g、蛋白胨5 g、葡萄糖20 g、琼脂20 g、水1 000 mL,分别以果糖、麦芽糖、甘露醇、蔗糖、乳糖、木糖、淀粉代替培养基中的葡萄糖,制成含不同碳源的培养基,每个碳源为

1个处理,每个处理3个重复,置25℃下恒温培养,逐日测量菌落直径至长满培养皿为止。

(5)孢子致死温度。在灭过菌的培养皿中,用无菌水配制孢子悬浮液各10 mL,分别置于35、40、45、50、55、60℃6个温度梯度下,10 min后吸1滴滴于载玻片上,悬滴液保湿48 h后,统计萌发率,以孢子不萌发的温度为孢子致死温度。

2 结果与分析

2.1 重寄生的自然寄生率及重寄生菌的形态鉴定

自然状态下的夏孢子堆中,菌寄生率达到48.3%。从供试的材料中共分离到3个属的重寄生菌,其形态特征如下:

青霉菌属重寄生菌(*Penicillium* sp.):菌落青绿色,分生孢子梗从菌丝上垂直生出,顶端分枝排列成帚状,分枝一次或多次,顶层有小梗,小梗再生分生孢子,分生孢子串成不分枝的链状,单个孢子球形或椭圆形,光滑,无色。

链格孢属重寄生菌(*Alternaria* sp.):菌落呈黑色,分生孢子梗暗色,单枝顶生不分枝,分生孢子暗色,有纵横隔膜,常成倒棍棒形、椭圆形。常形成链,单生的较少,顶端有喙状的附属丝,其分生孢子大小10~11.5 μm×6~8 μm。

枝孢属重寄生菌(*Cladosporium tenuissimum*):菌落呈黑色或褐色,孢子梗暗色,顶端或中部分枝,分生孢子褐色,1~4个细胞,常单生或串生,椭圆形至卵形,分生孢子大小为12~12.5 μm×5~6 μm。

2.2 温度对菌落生长及产孢的影响

由表1可以看出,该菌丝25~30℃时生长速度快,并且产孢量大,以25℃为最好。在5℃和40℃时菌丝生长停止,10、15、35℃时菌丝生长极缓慢,虽能较10℃产孢早,但量极少。故该菌的最适生长温度为25℃,高温或低温均不利于菌丝的生长和产孢。

表1 温度对*Cladosporium tenuissimum* 菌落生长和产孢的影响

Table 1 Colonial growth and spores produce of *Cladosporium tenuissimum* at different temperatures .

温度/℃	菌落直径/mm ^①				生长速度 /mm·d ⁻¹	出夏孢子天数 /d	菌落特征
	3d	4d	5d	6d			
5	0	0	0	0	0	0	无
10	9.3	11.6	19.5	21.8	3.6	4	菌落稀薄、淡色、孢子极少
15	13.7	21.5	25.3	34.9	5.8	3	菌落稀薄、白色、孢子极少
20	24.6	36.1	43.8	54.3	9.1	2	菌落稍厚、孢子多
25	35.0	47.2	57.8	68.4	11.4	2	菌落厚实、致密、孢子极多
30	31.4	43.2	53.6	64.0	10.7	2	菌落大而厚、孢子极多
35	16.6	20.8	24.0	30.4	5.3	2	菌落小而薄、色深、孢子量少
40	0	0	0	0	0	0	无

①菌落直径为5个培养皿的平均值;菌落特征为6 d的观察记载结果。

2.3 pH 值对菌丝生长及产孢的影响

由表 2 可以看出, *C. tenuissimum* 对酸碱度有较
强的适应能力, 在 pH 值为 3~11 的范围内均能
正常生长, 说明 pH 值对该菌菌落的生长影响不大,
最适于该菌生长和产孢的 pH 值为 4~6。

2.4 碳源对菌丝生长和产孢的影响

研究表明(表 3), 随着葡萄糖比例的增加, 菌落
直径以及菌丝致密程度增加, 而其产孢量也随之之增
加, 故在培养该菌时, 以糖量多为适宜。

表 2 pH 值对 *Cladosporium tenuissimum* 的菌落生长的影响
Table 2 Colonial growth of *Cladosporium tenuissimum* at various pH values

pH 值	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
菌落直径/mm ^①	0	17.8	75.0	73.6	72.4	68.0	68.0	70.2	71.8	70.8
生长速度/mm·d ⁻¹	0	2.9	12.5	12.3	12.1	11.3	11.3	11.7	12.0	11.7

①菌落直径为 3 个培养皿的平均值。

表 3 葡萄糖含量对 *Cladosporium tenuissimum* 的菌落生长和产孢的影响
Table 3 Colonial growth and spores produce of *Cladosporium tenuissimum* at various glucose proportions

葡萄糖含量/g·L ⁻¹	菌落直径/mm ^①				生长速度/ mm·d ⁻¹	出现孢子天数 /d
	3 d	4 d	5 d	6 d		
0	26.0	34.6	40.4	48.6	8.1	2
5	30.6	42.6	51.0	59.6	9.13	2
10	34.0	46.2	57.8	69.6	11.6	2
15	35.1	49.2	60.4	70.4	11.7	2
20	36.0	51.6	63.8	74.2	12.4	2
25	38.4	51.8	65.2	75.8	12.6	2
30	40.0	54.2	66.2	77.8	12.9	2

①菌落直径为 3 个培养皿的平均值。

碳源不同, 平均生长速度不同(图 1)。该菌在前
期的生长过程中, 因糖分不同而影响菌丝的生长
速度。前期生长以葡萄糖、果糖、麦芽糖以及甘露醇
4 种碳源为好; 而到后期, 对 8 种糖分的利用几乎无
差别, 均能正常生长和产孢, 但以果糖为最好, 平均
每天生长量为 12.93 mm, 其次为葡萄糖, 平均每天
生长量为 12.63 mm, 其他糖类的平均生长量在
11.17~11.87 mm 之间。

2.5 孢子致死温度

测定表明, 孢子在 25℃10 min 处理的萌发率为
85.3%, 30℃10 min 处理后萌发率为 65%, 35%10
min 处理后的萌发率为 24%, 45℃以及 45℃以上 10
min 处理后的萌发率均为 0。据此可以确定分生孢子
的致死温度为 45℃10 min。

3 结论与讨论

落叶松—杨栎锈菌的重寄生菌在 PDA 培养基
上能很好的生长, 其适宜温度 25~30℃, 最适为
25℃; 该菌能对酸碱度有较强的适应能力, 以 pH4~
6 为最好; 能较好的利用葡萄糖、果糖等碳源, 且丰
富的碳源能促进菌丝的生长, 也利于产孢。

研究中发现, 一些链格孢属(*Alternaria*)和青霉
属(*Penicillium*)的种类常与 *M. larici-populina* 伴
生, Omar & Heather (1979)曾对上述 2 种菌与枝孢
属的寄生性做过比较, 发现青霉对夏孢子的萌发有
边际效应, 而链格孢菌对夏孢子的萌发有抑制作用,
笔者没有发现上述两属真菌对锈菌寄生的直接证
据, 因而选枝孢菌作为研究对象。

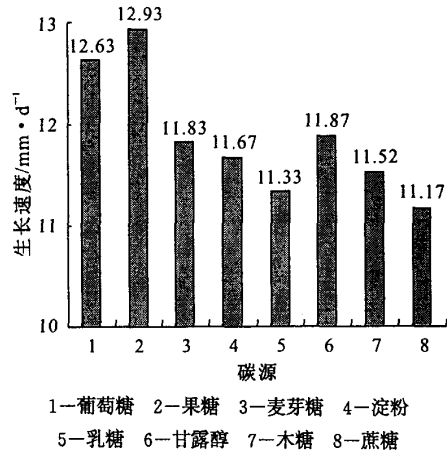


图 1 不同碳源对菌落生长的影响

Fig. 1 Colonial growth on various carbon sources

参考文献:

- [1] Omar M B, Heather W A. Effect of saprophytic phylloplane fungi on germination and development of *Melampsora larici-populina* [J]. Trans. Br. Mycol. Soc., 1979, 72(2): 225-231.
- [2] 李莲芝, 袁志文, 范健羽. 培养条件对锈寄生菌的影响[J]. 辽宁林业科技, 1989(6): 24-27.
- [3] 袁志文, 范健羽, 李连芝. 锈寄生菌对落叶松褐锈病抑制作用的观察[J]. 生物防治通报, 1991, 7(2): 61-63.
- [4] 袁秀英, 韩艳洁. 锈寄生菌控制杨柴锈病的研究 I. 锈寄生菌的形态鉴定及培养性状[J]. 内蒙古大学学报, 1998, 29(2): 250-254.
- [5] 袁秀英, 艳洁. 锈寄生菌对杨柴锈病菌的寄生及抗病作用[J]. 林业科学研究, 2000, 13(1): 103-106.
- [6] 黄云. 梨胶锈菌的重寄生菌研究 I. 重寄生菌的生物学特性[J]. 植物病理学报, 1994, 24(4): 329-335.
- [7] Sharma J K, Heather W A. Light and electron microscope studies on *Cladosporium tenuissimum*, mycoparasitic on poplar leaf rust, *Melampsora larici-populina* [J]. Trans. Br. Mycol. Soc., 1988, 90(1): 125-131.
- [8] Sharma J K. Parasitism of uredospores of *Melampsora larici-populina* Kleb. By *Cladosporium* sp. [J]. Eur. J. Pathol., 1978, 8(1): 48-54.
- [9] 袁嗣令. 中国乔灌木病害[M]. 北京: 科学出版社, 1997. 110.
- (上接第 107 页)
- [5] University of Lethbridge. Proceeding of the international workshop on sustainable land management for 21st century [R]. Vol. 2. Plenary Papers, Lethbridge, Canada, 1993.
- [6] Dumanski J. Assessing the sustainable of Saskatchewan framing system [R]. CLBRR Echnical Bulletin, 1994.
- [7] John E, Tiffen M, Mortimore M. Land resource management in the Machakos district, Kenya 1930—1990 [R]. World Bank Environment, 1994. 5.
- [8] Berroter R J, Zinck A. Criteria and indicators of agricultural sustainability at National level [R]. Geo Information for sustainable Land Management. ISSS/ITC, Enschede, Netherlands, 1997.
- [9] Gameda S, Dumanski J, Acton D. Farm level indicators of sustainable land management [R]. Geo Information for sustainable Land Management. ISSS/ITC, Enschede, Netherlands, 1997.
- [10] Lefroy R D B, Bechstedt H D, Rais M. Indicators for sustainable land management based on farmer surveys in Vietnam, Indonesia and Thailand [J]. Agriculture, Ecosystem and Environment, 2000, 81(2): 137-146.
- [11] 冷疏影, 李秀彬. 土地质量指标体系国际研究的新进展[J]. 地理学报, 1999, 54(2): 177-185.
- [12] Pieri C, Dumanski J, Young A. Land quality indicators [R]. World Bank Discussion, 1995. 51.
- [13] Pieri C. Planning of sustainable land management: the hierarchy of user needs [R]. Geo Information for sustainable Land Management. ISSS/ITC, Enschede, Netherlands, 1997.
- [14] 彭建, 王仰麟, 宋治清, 等. 国内外土地持续利用评价研究进展[J]. 资源科学, 2003, 25(2): 87.
- [15] MLUI. Soil quality, contaminated land and waste utilization [R]. Annual Report of MLUI. 1997. 28-37.
- [16] Murage E W, Karanja N K, Smithson P C, et al. Diagnostic indicators of soil quality in productive and non-productive small holders' fields of Kenya's Central Highlands [J]. Agriculture, Ecosystems and Environment, 2000, 79: 1-8.
- [17] Jeffrey E H. Soil quality: an indicator of sustainable land management [J] Applied Soil Ecology, 2000, 15(1): 75-83.
- [18] 陈美球, 刘桃菊, 黄靓. 土地生态系统健康研究的主要内容和面临的问题[J]. 生态环境, 2004, 13(4): 698-701.
- [19] 陈美球, 吴次芳. 土地健康研究进展[J]. 江西农业大学学报(自然科学版), 2002, 24(3): 324-329.
- [20] 钟政林, 曾光明, 杨春平. 环境风险评价研究进展[J]. 环境科学进展, 1996, 4(6): 17-21.
- [21] 傅伯杰. 土地生态系统的特征及其研究的主要方面[J]. 生态学杂志, 1985, 4(1): 35-38.
- [22] 杨子生. 试论土地生态学[J]. 中国土地科学, 2000, 14(2): 38-43.
- [23] 郭旭东, 邱扬, 连纲, 等. 基于 PSR 框架的土地质量指标体系研究进展与展望[J]. 地理科学进展, 2003, 22(5): 483-484.
- [24] 范楚林, 李维义. 黑泉库区土地生态评价定量系统模型研究[J]. 青海环境, 1997, 7(3): 105.
- [25] 门宝辉, 梁川. 物元模型在土地生态系统定量评价中的应用[J]. 水土保持学报, 2002, 16(6): 63-64.
- [26] 张建辉, 李勇. 长江上游农业土地持续管理的评价指标[J]. 西南农业学报, 1999, 12(土肥专辑): 109-114.
- [27] 刘玉平. 干旱土地退化生态系统的评价方法[J]. 干旱区研究, 1996, 13(1): 72-76.