

落叶松-杨栅锈菌夏孢子萌发条件研究

郭志青, 曹支敏, 余仲东*

(西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨陵 712100)

摘要:以落叶松-杨栅锈菌(*Melampsora larici-populina*)的 Th₀₅₃ (Th)和 Gl₀₅₁ (Gl)菌系为材料, 通过研究不同温度、不同琼脂糖浓度及叶片浸出液对夏孢子萌发的影响, 分析影响夏孢子萌发的因素。结果表明: (1)在供试温度范围(0~30℃)内, 琼脂糖浓度对夏孢子萌发没有显著影响, 但最高温度(32℃)时, 高琼脂糖浓度对夏孢子的萌发有明显的促进作用; (2)夏孢子萌发的最适温度为 20℃, 最低萌发温度为 5℃, 最高萌发温度为 32℃, 高于 32℃几乎不萌发。在最适温度下, Th 菌系 6~8 h 萌发速率最大, 24 h 累计萌发率达 63.40%; Gl 菌系 4~6 h 萌发速率最大, 前 24 h 累计萌发率达 60.28%; (3)不同浓度的太白杨叶片浸出液对该锈菌夏孢子萌发有不同程度的影响, 10 g·L⁻¹的水浸液对夏孢子萌发有明显的促进作用, 但高浓度的水浸液、叶组织粉碎抽取液对夏孢子萌发具有抑制作用。

关键词:落叶松-杨栅锈菌; 温度; 琼脂糖浓度; 叶片浸出液; 萌发条件

中图分类号:S763.150.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2010)03-0118-04

Germination Conditions of Urediospores of *Melampsora larici-populina*

GUO Zhi-qing, CAO Zhi-min, YU Zhong-dong

(College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The roles of temperatures, agarose concentrations and foliages water extracts to the germination of urediospores of *Melampsora larici-populina* were studied. The results showed (1) Agarose concentration didn't have significant effect on urediospore germination while the temperature was blew 30℃. But high agarose concentration promoted urediospores germination at the temperature of 32℃. (2) The optimal temperature was 20℃. The lowest germination temperature was below 5℃ and the uploaded temperature was 32℃. At the optimal temperature conditions, germinating speed of isolate Th₀₅₃ was the highest during culturing 6~8 h, and the 24 h accumulation germination rate reached 63.40%. Isolate Gl₀₅₁ germination speed at 4~6 h was the highest, and the 24 h accumulation germinating rate reached 60.28%. (3) Concentrations of the water extracts had different effect to urediospores germination. Water extract concentration at 10 g·L⁻¹ promoted obviously the rate of urediospores germination, however, concentrations higher than 10 g·L⁻¹ of water extracts and crushed foliages tissue extracts inhibited urediospores germinating.

Key words: *Melampsora larici-populina*; temperature; agarose concentration; foliage extract; germination percentage

落叶松-杨栅锈菌属于长生活史锈菌^[1-2], 引起落叶松和杨树锈病, 对青杨、欧美杨等危害较大^[3-5]。该锈菌夏孢子阶段, 可随气流远距离传播, 侵染时间长, 可重复侵染杨树叶片^[6-7]。受害杨树因叶片布满

夏孢子堆, 使叶片褪绿产生病斑而影响光合作用, 使叶片提前脱落, 枯梢, 降低了林木生长量^[8]。研究不同温度、不同琼脂糖浓度和叶片浸出液对夏孢子萌发率的影响, 探索夏孢子萌发的最适条件及夏孢子

收稿日期: 2009-09-01 修回日期: 2009-10-09
基金项目: 国家自然科学基金(30771734; 30872027); 陕西省自然科学基金(陕 2008C109)
作者简介: 郭志青, 女, 在读硕士研究生, 主要从事森林病理学研究。
* 通讯作者: 余仲东, 男, 副教授, 主要从事森林病理学研究。E-mail: yu-10083@163.com。

芽管融合的最适条件,为进一步研究落叶松-杨栅锈夏孢子异核现象^[9-12]及致病性变异奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌种

采用2个不同的菌系,其中Th₀₅₃(简称Th)属于CLMP₁小种,采于太白山厚喙子太白杨(*Populus purdomii*)上;Gl₀₅₁(简称Gl)属于CLMP₂小种,采于甘肃临夏的青杨(*P. cathayana*)上。

1.2 不同因素对夏孢子萌发的影响

1.2.1 温度、琼脂糖浓度对夏孢子萌发的影响 在灭菌的载玻片上制成不同浓度的琼脂糖薄膜^[13-14],琼脂糖浓度分别为0.5%、0.7%、1.0%、1.5%、2.0%,琼脂糖培养基融化后用移液枪取500 μL,在灭菌的载玻片上制成面积约4.0 cm×2.5 cm琼脂糖薄膜,用灭菌干净小毛笔将夏孢子均匀抖落于不同浓度的琼脂糖薄膜上培养,在10×物镜下每视野约200个夏孢子,每个处理3个重复,置于培养皿中的玻璃弯管上,同时在培养皿中加10 mL水,然后加盖培养皿盖,并用Parafilm封口膜将培养皿封好,分别置于0(冰箱)、5、10、20、22、24、26、30、32℃智能生化培养箱中黑暗培养^[15-18],2、4、6、8、12、24、28、36、48、52、60、72 h后,以芽管伸长大于孢子直径的1/2以上作为萌发标准,在光学显微镜下观测夏孢子的萌发情况^[13-19],每个重复观察3个视野。

累积萌发率=累积萌发孢子个数/观察视野孢子总数

萌发速率=相邻时间段萌发率之差/间隔时间

24 h累积萌发率=前24 h累积萌发孢子个数/观察视野孢子总数

1.2.2 太白杨叶片浸出液对夏孢子萌发的影响

(1)叶组织水浸液的制备。取洗净的太白杨叶片10 g,切成0.5 cm×0.5 cm的小块放在洁净的烧杯中,倒入50 mL灭菌自来水,20℃浸泡24 h^[20],然

后抽取得到滤液A,并在4℃保存。浸出液浓度以每升水中所含活体太白杨叶片鲜重表示^[21]。

(2)叶组织粉碎抽取液的制备。取洗净的太白杨叶片10 g,剪碎,用液氮研磨粉碎,置于灭菌的烧杯中,倒入50 mL已灭菌的自来水,用玻璃棒充分搅匀,然后抽取得到滤液B,并在4℃保存。浸出液的浓度以每升水中所含活体太白杨叶片鲜重表示^[21]。

(3)太白杨叶片浸出液对夏孢子萌发的影响。用2%的水琼脂将滤液A、滤液B分别稀释成100、50、10 g·L⁻¹的浓度,并在灭菌的载玻片上制成面积4.0 cm×2.5 cm琼脂糖薄膜,用灭菌干净小毛笔将夏孢子均匀抖落于不同浓度的琼脂糖薄膜上培养,共6个处理;对照不加浸出液,每个处理做3个重复,每个重复观察3个视野,具体方法同“1.2.1”,24 h后统计孢子的萌发率。

1.3 统计与分析

用Excel对数据进行处理分析并绘制不同温度、浓度的萌发率趋势图。用SAS软件对不同琼脂糖浓度、不同温度及叶片浸出液处理的24 h累积萌发率进行Fisher’s LSD多重比较。

2 结果与分析

2.1 温度对夏孢子萌发的影响

在供试温度范围内,0℃条件下,夏孢子不能萌发。5℃条件下有较高萌发率,24 h后Th和Gl菌系的累积萌发率分别达15.82%和7.26%(表1)。在20℃条件下,夏孢子2 h开始萌发,4 h后孢子萌发数迅速增长,8~12 h达到萌发高峰。20℃时Th菌系72 h累积萌发率最高,为81.99%;Gl菌系72 h累积萌发率为81.23%。20℃为夏孢子萌发的最适温度,超过24℃时夏孢子的萌发率显著降低,超过32℃时萌发率很低甚至不萌发,此结果与该锈菌的自然发生温度基本相符合^[1]。

表1 温度对落叶松-杨栅锈菌夏孢子(Th、Gl菌系)萌发的影响
Table 1 Effect of temperatures on the germination of uredionspores

| 温 度/℃ | 镜检孢子数/个 | | 萌发孢子数/个 | | 24h 累积萌发率/% | | 显著性(<i>p</i> <0.01) | |
|-------|---------|-----|---------|----|-------------|-------|----------------------|----|
| | Th | Gl | Th | Gl | Th | Gl | Th | Gl |
| 5 | 196 | 179 | 31 | 13 | 15.82 | 7.26 | D | E |
| 10 | 141 | 152 | 61 | 86 | 42.99 | 56.60 | C | AB |
| 20 | 145 | 145 | 92 | 87 | 63.40 | 60.28 | A | A |
| 22 | 142 | 163 | 73 | 84 | 51.17 | 51.23 | B | B |
| 24 | 152 | 151 | 57 | 60 | 37.54 | 39.48 | C | C |
| 26 | 167 | 156 | 36 | 35 | 21.56 | 22.51 | D | D |
| 30 | 161 | 138 | 11 | 7 | 6.88 | 5.05 | E | E |
| 32 | 158 | 161 | 5 | 3 | 3.28 | 1.67 | E | E |

在最适温度 20℃时,Th 和 Gl 菌系的萌发率最大,72 h 累积萌发率分别达到 81.99%和 81.23% (图 1)。

图 1 Th、Gl 菌系在最适温度下的累积萌发率

Fig. 1 Comparison of accumulation germination rate at optimal temperature

Th 菌系在较低温度(5℃)和较高温度(30℃、32℃)的萌发率高于 Gl 菌系,在最适温度(20℃)时,Th 菌系的萌发率也高于 Gl 菌系,说明 Th 菌系对温度的适宜性较强(图 2)。

图 2 Th、Gl 菌系在不同温度下的萌发率

Fig. 2 Comparison of accumulation germination rate at different temperatures

2.2 琼脂糖浓度对夏孢子萌发的影响

研究表明,在 0~30℃时,琼脂糖浓度对夏孢子萌发没有显著影响(表 2)。

在 20℃条件下,不同琼脂糖浓度处理之间 24 h 累积萌发率没有显著差异($p<0.05$)(表 3)。

表 2 20℃条件下不同琼脂糖浓度对夏孢子 (Th 菌系)萌发的影响

Table 2 Effect of different agarose concentrations on the germination of uredionspores at 20℃

| 琼脂糖浓度 /% | 镜检孢子 /个 | 萌发孢子 /个 | 24 h 累积萌 发率/% |
|----------|---------|---------|---------------|
| 0.5 | 167 | 97 | 58.39 |
| 0.7 | 145 | 92 | 63.41 |
| 1.0 | 160 | 94 | 59.21 |
| 1.5 | 162 | 101 | 62.84 |
| 2.0 | 136 | 136 | 63.20 |

在最高温度 32℃条件下,随着琼脂糖浓度升高,萌发率(Th 菌系 24 h 累积萌发率)有增高趋势,但低于 20℃条件下萌发率(表 3)。

在 32℃条件下,高浓度的琼脂糖处理(1.5%~2.0%)与低浓度琼脂糖处理(0.5%~1.0%)存在极

显著差异,这可能与高温下不同浓度的琼脂糖保持水分能力有关。也可以证明琼脂糖在夏孢子萌发过程中不能起营养作用,只是起到保湿、固定夏孢子的作用。

表 3 32℃条件下不同琼脂糖浓度对夏孢子 (Th 菌系)萌发率的影响

Table 3 Effect of different agarose concentrations on the germination of uredionspores

| 琼脂糖浓度 /% | 镜检孢子 /个 | 萌发孢子 /个 | 24 h 累积萌 发率/% | 显著性 ($p<0.01$) |
|----------|---------|---------|---------------|------------------|
| 0.5 | 147 | 5 | 3.28 | B |
| 0.7 | 158 | 6 | 3.82 | B |
| 1.0 | 146 | 6 | 4.05 | B |
| 1.5 | 151 | 10 | 6.63 | AB |
| 2.0 | 145 | 12 | 8.22 | A |

2.3 太白杨杨叶片浸出液对夏孢子萌发的影响

滤液 A 的 100 g·L⁻¹和 50 g·L⁻¹对夏孢子萌发有抑制作用,10 g·L⁻¹浓度对夏孢子萌发有明显的促进作用,表明高浓度抑制夏孢子萌发,低浓度促进夏孢子的萌发,萌发率提高 9.2%;滤液 B 不同浓度对夏孢子萌发都有抑制作用,浓度越高,抑制作用越明显(表 4)。

表 4 太白杨叶片浸出液对落叶松-杨栅锈菌 夏孢子 (Gl 菌系)萌发的影响

Table 4 Effect of different concentrations of the water extracts on the germination of uredionspores

| 基质 | 浓度 /(g·L ⁻¹) | 镜检孢子 /个 | 萌发孢子 /个 | 24 h 累积萌 发率/% | 显著性 ($p<0.01$) |
|--------|--------------------------|---------|---------|---------------|------------------|
| CK(对照) | 灭菌自来水 | 328 | 265 | 80.80 | B |
| 滤液 A | 100 | 363 | 248 | 68.36 | C |
| | 50 | 350 | 272 | 77.46 | B |
| | 10 | 361 | 325 | 90.00 | A |
| 滤液 B | 100 | 330 | 155 | 46.85 | D |
| | 50 | 344 | 232 | 67.70 | C |
| | 10 | 355 | 276 | 77.74 | B |

3 结论与讨论

琼脂糖薄膜法相对于离体叶片培养的优点是便于夏孢子萌发的观察和统计。离体叶片培养由于叶绿素的存在而夏孢子芽管透明不易观察,而悬滴法萌发率很低,误差较大。

Th、Gl 菌系由于采集的地点不同,在实验过程中 Th 菌系的温度范围较广,在极限温度 5℃和 32℃时萌发率明显高于 Gl 菌系,说明两菌系对温度的适应性存在差异。同时,在 32℃高温条件下,两菌系的分支明显增多,但芽管萌发的最短时间延后,8~12 h 才开始萌发,芽管生长很慢。夏孢子在适宜的条件下萌发产生 1~4 个芽管,芽管在伸长 24 h 后形成丰富树杈状分支。实验中观察到形成芽管弯

曲成环或芽管结节体等特殊结构。

高浓度的太白杨叶片浸出液对夏孢子的萌发有明显抑制作用,低浓度的叶片水浸液对夏孢子萌发有促进作用,这可能与浸出液中酚类及其氧化产物、蛋白质及其浓度有关^[22]。

在夏孢子芽管萌发试验中,随着时间的延长,2 个夏孢子芽管相遇,融合成“Y”型,结合后两芽管之间没有空隙;也有的融合一段时间后又各自生长。也有 3 个夏孢子芽管结合在一起的现象,但其结合后形状不规则,从统计数据来看,在最适萌发温度(20℃)时,芽管融合最多。菌丝(芽管)融合是产生异核体的途径之一^[10],芽管融合体的这一发现,为落叶松-杨栅锈菌通过异核作用产生新的小种提供了可能。

参考文献:

[1] 刘春梅. 落叶松-杨栅锈菌生理小种鉴定[D]. 陕西 杨陵:西北农林科技大学,2007.
LIU C M. Physiological race indentification of *Melampsora larici-populina* Kleb. [D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University,2007.

[2] 田呈明,李振岐,康振生. 青杨叶锈病(*Melampsora larici-populina* Kleb.)研究进展[J]. 西北林学院学报,1999,14(2):81-88.
TIAN C M,LI Z Q,KANG Z S. Advances in researches of cathay poplar leaf rust (*Melampsora larici-populina* Kleb.)[J]. Journal of Northwest Forestry University,1999,14(2):81-88.

[3] 周仲铭,袁毅. 杨树叶锈病的研究概况[J]. 北京林学院学报,1985,4(9):84-102.

[4] PINON J. Frequency and evolution of *Melampsora larici-populina* Kleb. races in north-western France[J]. Annales des Sciences Forestieres ,1992 ,49(1):1-15.

[5] PINON J,FREY P. Structure of *Melampsora larici-populina* populations on wild and cultivated poplar[J]. Eur. J. Plant Pathology,1997,103(2):159-173.

[6] 郝俊贞. 呼和浩特市青杨叶锈病侵染循环和发病规律的研究[J]. 内蒙古林学院学报,1990(2):20-27.
HAO J Z. Study on the cycle of infection and mode of development of the leaf rust of cathay poplar caused by *Melampsora larici-populina* Kleb. in Huhhot[J]. Journal of Inner Mongolia Forestry College,1990(2):20-27.

[7] 景耀,杨俊秀,王培新. 杨树锈病[M]. 西安:陕西科学技术出版社,1988.

[8] 张山林,马晓,卫本舒. 青杨叶锈病在临夏州的流行规律及其防治技术研究[J]. 甘肃林业科技,1991(2):43-50.

[9] 裴静宇. 小麦条锈菌异核现象研究及 SSR 分子标记建立[D]. 长春:吉林农业大学,2006.
PEI J Y. Study on heterokaryosis and SSR markers analysis of

Puccinia striiformis West. f. sp. Tritzci[D]. Changchun:Jilin Agricultural University,2006.

[10] 马青,李振岐,康振生. 禾谷类锈菌异核现象的研究进展[J]. 国外农学-麦类作物,1992(5):47-49.

[11] 马青,魏国荣,康振生. 向日葵锈菌夏孢子芽管在向日葵叶片上的结合现象及核相研究[J]. 西北农业学报,1994,3(3):82-84.
MA Q,WEI G R,KANG Z S. Fusion and nuclear phase of urediospore germ tubes in *Puccinia helianthi* Schw. on sunflower leaves[J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica,1994,3(3):82-84.

[12] 马青,康振生,李振岐. 小麦条锈菌夏孢子芽管在小麦叶片上结合现象的研究[J]. 西北农业大学学报,1993,21(2):97-98.
MA Q,KANG Z S,LI Z Q. The fusion of urediospore germ tubes in *Puccinia striiformis* West. on wheat leaves[J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica,1993,21(2):97-98.

[13] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京:中国农业出版社,1998.
FANG Z D. Methods for research on plant pathology[M]. Beijing:China Agriculture Press,1998.

[14] 李振岐,商鸿生. 小麦锈病及其防治[M]. 上海:上海科学技术出版社,1989.

[15] 曾永三,王振中,赵琛. 豇豆锈菌夏孢子接种条件的研究[J]. 中国蔬菜,1993(3):10-13.
ZENG Y S,WANG Z Z,ZHAO C. Studies on conditions for sporulation and inoculation of uredospores of cowpea rust pathogen[J]. China Vegetables,1993(3):10-13.

[16] 廖安平,叶华智,严吉明. 温度对红花柄锈菌锈孢子萌发及侵染的影响[J]. 中国植保导刊,2008(5):36-37.

[17] 张永红,黄丽丽,康振生. 小麦条锈菌 CY32 夏孢子萌发条件[J]. 菌物学报,2006,25(4):656-659.
ZHANG Y H, HUANG L L,KANG Z S. Study on germination condition of urediospores of *Puccinia striiformis* f. sp. tritici[J]. Mycosystema,2006,25(4):656-659.

[18] MUELLER D S,BUCK J W. Effects of light, temperature, and leaf wetness duration on daylily rust[J]. Plant Disease,2003(87): 442-445.

[19] STAPLES R C,MACKO V. Germination of urediospore and differentiation of infection structures[J]. The Cereal Rusts,1984(1):255-289.

[20] 钱振官,沈国辉,柴晓玲,等. 加拿大一枝黄花浸出液对杂草种子发芽的影响[J]. 杂草科学,2005(2):18-20.

[21] 舒阳,刘振乾,李丽君. 凤眼莲浸出液对东海原甲藻生长的抑制作用[J]. 生态科学,2006,25(2):124-127.
SHU Y,LIU Z Q,LI L J. Inhibitory effect of extracts from *Eichhornia crassipes* on the growth of *Prorocentrum donghaiense*[J]. Ecological Science,2006,25(2):124-127.

[22] JOHNSON J D,YONG K. The role of leaf chemistry in *Melampsora medusae* infection of hybrid poplar: Effects of leaf development and fungicide treatment [J]. Canadian Journal of Forest Research,2005,35(4):763-771.