

营养因素与培养条件对 *Pilidium concavum* 病菌 菌丝生长及产孢量的影响

段亚冰, 余真真, 陈艳利, 康业斌

(河南科技大学 林学院, 河南 洛阳 471003)

摘 要: 为了探讨不同培养基、碳氮源、温度、pH 值、光照对 *Pilidium concavum* (Desm.) Hohn. 菌丝生长及分生孢子产量的影响。试验采用交叉法测量菌丝生长量, 用血球计数板法测量产孢量。结果表明: 该菌在 PDA 上生长最适, 在 PYA 上产孢最多。在最适培养基上培养, 菌丝生长的适宜温度为 15~30℃, 最适温度为 25℃, 产孢最适温度为 30℃; 在 pH 值 6~11 范围内该菌均能生长和产孢, 菌丝生长的最适 pH 值为 6, pH 值为 11 产孢最多; 光照对菌丝生长、产孢无显著影响; 在供试的碳氮源中, 菌丝生长及产孢以葡萄糖、酵母膏最适。

关键词: *Pilidium concavum*; 营养因素; 培养条件; 分生孢子

中图分类号: Q 949.321 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2010)04-0164-04

Pilidium concavum (Desmaz.) Hohn. [共无性型 *Hainesia lythri* (Desmaz.) Hohn.; 有性型 *Discohainesia oenotherae* (Cooke & Ellis) Nannf.]^[1-3] 是国内报道为害牡丹的又一种病原真菌, 目前在河南洛阳、郑州等地均有发生^[4]。病菌一般在 7 月份开始侵染牡丹叶片, 初为长圆形红褐色小斑, 略凹陷, 中央灰白色, 后期病斑逐渐扩大, 黄褐色, 边缘淡褐色, 具有明显同心轮纹, 中部有呈轮状排列的桔红色粘质团小点, 8~9 月份多雨潮湿时田间发病率较高, 危害严重。为了掌握其发生规律, 试验对其部分生物学特性进行了研究, 为进一步控制该病的发生危害提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

样材采于河南省洛阳市国家牡丹园, 进行常规组织分离, 再经过单孢分离后获得病原菌纯培养^[5]。采用 CTAB 法^[6]并作适当改进提取基因组 DNA, 进行 PCR 扩增, PCR 产物经纯化后克隆测序(由上海生工公司完成)。对测得的菌株 rDNA ITS 序列运用 GenBank 中的 BLAST 工具在 DNA 序列数据库中搜索同源 DNA 序列进行比对后确定为 *Pilidium concavum* (Desmaz.) hohn., 在 PDA 培养基上扩大繁殖备用。

第一作者简介: 段亚冰(1983-), 男, 河南周口人, 在读硕士, 研究方向为植物免疫学。E-mail: yabing0324@163.com。

通讯作者: 康业斌(1964-), 男, 河南唐河人, 博士, 教授, 现主要从事植物免疫学研究工作。E-mail: kangyb999@163.com。

基金项目: 河南科技大学博士启动基金资助项目(200709001215)。

收稿日期: 2009-10-09

1.2 试验方法

1.2.1 不同培养基对病原菌菌丝生长及产孢量影响的测定 将直径 4 mm 的菌饼接种于 PDA, PSA, Czapek, OMA, CMA, PYA, PCA, YA, WA, 基础培养基^[7](其配方为 K₂PO₄ 1 g, KCl 0.5 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g, FeSO₄ 0.01 g, 琼脂 17 g, 蒸馏水 1 000 mL, 碳源 30 g, 氮源 2 g)等平板培养基上, 于 25℃下培养, 每个处理 3 皿, 重复 3 次, 7 d 后用交叉法测量菌落直径, 观察菌落生长状况, 8 d 后用血球计数法^[8]测定分生孢子产生量(下同)。

1.2.2 不同碳源对病原菌菌丝生长及产孢量影响的测定 在基础培养基中, 以酵母膏为氮源, 分别测定葡萄糖、蔗糖、淀粉、乳糖、麦芽糖对菌丝生长和产孢的影响, 以无碳源培养基 WA 为 CK, 每个处理 3 皿, 重复 3 次, 7 d 后用血球计数测量菌落直径, 8 d 后计测产孢量。

1.2.3 不同氮源对病原菌菌丝生长及产孢量影响的测定 在基础培养基中, 以葡萄糖为碳源, 分别测定 KNO₃、蛋白胨、酵母膏、牛肉膏对菌丝生长和产孢的影响, 以无氮源培养基 WA 为 CK, 每个处理 3 皿, 重复 3 次, 7 d 后测量菌落直径, 8 d 后计测产孢量。

1.2.4 不同 pH 值对病原菌菌丝生长及产孢量影响的测定 将 PDA 培养基分别用 0.1 M HCl 和 NaOH 调成 pH 值为 4~11 的 8 个梯度, 接种直径约 4 mm 的菌饼于 PDA 平板中央, 于 25℃下恒温培养, 每个处理 3 皿, 重复 3 次, 7 d 后测量菌落直径, 8 d 后计测产孢量。

1.2.5 不同温度对病原菌菌丝生长及产孢量影响的测定 将直径 4 mm 的菌饼接种于 PDA 培养基上, 置于 5~35℃等 7 个温度梯度下培养, 每个处理 3 皿, 重复 3 次, 7 d 后测量菌落直径, 8 d 后计测产孢量。

1.2.6 不同光照条件对病原菌菌丝生长及产孢量影响的测定 在 PDA 平板培养基中央接种 4 mm 菌饼,于 25℃下分别置于连续光照、连续黑暗、12 h 光照/12 h 黑暗、自然光等 4 个处理,每个处理 3 皿,重复 3 次,7 d 后测量菌落直径,8 d 后计测产孢量。

1.3 数据分析

采用统计软件 DPS 7.01 中的新复极差法^[9] 分析各数据间的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 培养基对病菌菌丝生长及产孢量的影响

该菌在 CMA、基础培养基、PDA 等不同培养基上 25℃恒温条件下培养 7 d 后对菌落直径的测定结果表明,该菌在 CMA 上菌落生长最大,其菌落直径达 4.97 cm,其次为基础培养基和 PDA,菌落直径分别为 4.89 cm 和 4.80 cm,查氏培养基上生长最差,菌落直径仅 2.31 cm,但在 CMA 和基础培养基上菌丝生长很稀

疏,在 PDA 上生长快 2~3 d 即可形成肉眼可见的菌落,菌丝黄褐色,绒毛状,生长致密,菌落正面浅褐色,背面暗褐色,正面和背面均可见同心轮纹,镜检分生孢子,单孢、无色、长椭圆形,所以 PDA 最适合该菌生长。8 d 后对产孢量统计结果表明, PYA 产孢量达 71.79×10⁶个/mL,而在 WA 培养基上不产孢(表 1、2)。

表 1 牡丹炭疽病菌在不同培养基上培养性状

培养基名称	培养性状
CMA	菌丝白色,菌落圆形 较薄 中央有橙黄色分生孢子堆
基础培养基	菌丝白色,菌落圆形 较厚 中央有橙黄色分生孢子堆
PDA	菌落厚实,菌丝浓密 边缘整齐,中央灰褐色,质密,边缘淡褐色
OMA	菌丝白色,疏松,菌落圆形 较厚,中央少许橙黄色分生孢子堆
PYA	菌丝白色,菌落圆形 较薄 中央产生许多橙黄色分生孢子,较密集
PSA	菌丝黄褐色 绒毛状 菌落圆形,中央产生橙黄色分生孢子堆
PCA	菌丝白色,较稀疏,中央有橙黄色分生孢子堆
YA	菌丝白色,菌落圆形 产孢极少
WA	菌丝白色,较稀疏,无产孢
Czapek	菌丝白色,菌落圆形 有分生孢子堆

表 2 不同培养基对菌丝生长情况及产孢量的影响

培养基	菌丝生长情况	菌落直径/cm	差异显著性		产孢量/×10 ⁶ 个·mL ⁻¹	差异显著性	
			SSR0.05	SSR0.01		SSR0.05	SSR0.01
CMA	+++++	4.97	a	A	3.10	cde	CD
基础	+++++	4.89	a	A	45.00	b	B
PDA	+++++	4.80	a	AB	7.67	c	C
OMA	+++++	4.56	b	B	6.63	c	CD
PYA	+++++	4.56	b	B	71.79	a	A
PSA	+++	4.25	c	C	5.25	cd	CD
PCA	+++	4.11	c	C	4.21	cde	CD
YA	++	3.40	d	D	0.75	de	CD
WA	+	2.48	e	E	0	e	D
Czapek	+	2.31	e	E	1.00	de	CD

注“+++++”最好,“菌落厚实 菌丝致密”;“++++”较好,“菌落较大,菌丝稀薄”;“+++”好,“生长缓慢 菌落较小”;“++”差,“菌落较小 菌丝稀薄”;“+”最差“菌丝稀薄 菌落边缘不整齐”;“-”不生长

2.2 碳源对病原菌菌丝生长及产孢量的影响

该菌对碳源的利用以葡萄糖最佳,淀粉、乳糖、麦芽糖次之,蔗糖最差。以葡萄糖、淀粉、乳糖、麦芽糖为碳

源的培养基上菌丝白色,菌落厚实,中央密生白色分生孢子堆,且以葡萄糖为碳源的培养基上产孢最多,以蔗糖为碳源的培养基上不产孢(表 3)。

表 3 不同碳源对菌丝生长和产孢量的影响

碳源	菌落直径 / cm	差异显著性		产孢量 /×10 ⁶ 个·mL ⁻¹	差异显著性	
		SSR0.05	SSR0.01		SSR0.05	SSR0.01
葡萄糖	5.30	a	A	72.23	a	A
淀粉	4.81	b	B	38.44	b	B
乳糖	4.68	b	B	23.39	c	C
麦芽糖	4.60	b	B	42.00	b	B
蔗糖	4.09	c	C	0	d	D
CK	2.26	d	D	4.42	d	D

2.3 氮源对病原菌菌丝生长及产孢量的影响

菌丝生长适宜的氮源为酵母膏、牛肉膏,蛋白胨次之,KNO₃最差。以酵母膏为氮源的培养基上菌落厚实,边缘菌丝呈稀疏绒毛状,中央产生密集的白色分生孢子堆,以牛肉膏以为氮源的培养基上菌落稀薄,中央黄褐色,以 KNO₃以为氮源的培养基上菌落稀薄,边缘呈雪花

状不整齐,生长缓慢,分生孢子堆最少;CK 菌落稀薄,菌落边缘散生分生孢子堆。

2.4 pH 值对病原菌菌丝生长及产孢量的影响

该菌在 pH 值 4~11 均能生长,菌丝生长的适宜 pH 值为 4~7,最适 pH 为 6;在 pH 值 6~11 均能产孢,产孢的最适 pH 为 11,在 pH 值为 4~5 时不产孢(表 5)。

表 4 不同氮源对菌丝生长和产孢量的影响						
碳源	菌落直径 / cm	差异显著性		产孢量 /×10 ⁶ 个·mL ⁻¹	差异显著性	
		SSR0.05	SSR0.01		SSR0.05	SSR0.01
酵母膏	4.94	a	A	72.23	a	A
牛肉膏	4.89	a	A	1.06	b	B
蛋白胨	4.29	b	B	1.66	b	B
KNO ₃	1.65	d	D	0.94	b	B
CK	2.26	c	C	4.42	b	B

表 5 不同 pH 值对菌丝生长产孢量的影响						
pH	菌落直径 / cm	差异显著性		产孢量 /×10 ⁶ 个·mL ⁻¹	差异显著性	
		SSR0.05	SSR0.01		SSR0.05	SSR0.01
6	4.96	a	A	5.56	e	E
5	4.74	ab	AB	0	f	F
4	4.68	bc	AB	0	f	F
7	4.45	c	B	9.67	d	D
8	3.93	d	C	10.68	d	D
9	3.86	d	C	24.13	c	C
10	3.79	d	C	35.86	b	B
11	3.41	e	D	80.50	a	A

2.5 温度对病原菌菌丝生长及产孢量的影响 均能产孢,温度为 30℃产孢最高,低于 15℃和高于 30℃
菌丝生长适温 20~30℃,最适温度为 25℃,低于 均不产孢(表 6)。
5℃和高于 35℃菌丝生长缓慢甚至不生长;在 20~30℃

表 6 不同温度对菌丝生长情况及产孢量的影响						
温度/℃	菌落直径 / cm	差异显著性		产孢量 /×10 ⁶ 个·mL ⁻¹	差异显著性	
		SSR0.05	SSR0.01		SSR0.05	SSR0.01
5	0.74	f	E	—	d	D
10	1.54	e	D	—	d	D
15	3.04	d	C	—	d	D
20	4.03	c	B	3.10	c	C
25	4.85	a	A	7.96	b	B
30	4.29	b	B	22.91	a	A
35	0	g	F	—	d	D

2.6 光照条件对病原菌菌丝生长及产孢量的影响 丝生长及产孢的影响不显著,光照并不利于菌丝生长及
菌丝生长以自然光和连续黑暗相对较好,产孢以 产孢(见表 7)。
12 h 光照/12 h 黑暗和自然光相对较好。表明光照对菌

表 7 不同光照对菌丝生长情况及产孢量的影响						
光照	菌落直径 / cm	差异显著性		产孢量 /×10 ⁶ 个·mL ⁻¹	差异显著性	
		SSR0.05	SSR0.01		SSR0.05	SSR0.01
自然光	4.95	a	A	19.39	a	A
全黑暗	4.94	a	A	7.71	b	B
半光照	4.72	a	A	20.94	a	A
全光照	3.26	b	B	7.79	b	B

3 结论 该菌菌丝生长的最适培养基为 PDA,分生孢子产生的最适培养基为 PYA。在最适培养基上培养,菌丝生长的最适温度为 25℃,产孢的最适温度为 30℃;菌丝生长的最适 pH 为 6,pH 为 11 产孢最多;光照对菌丝生长、产孢无显著影响;最有利于菌丝生长及产孢量的碳源氮为葡萄糖与酵母膏。

concavum and *Hainesia lythri* (Coelomycetes)[J]. *Mycologia*, 1994, 83(6): 787-796.

[3] 许志刚.拉汉-汉拉植物病原生物名称[M].北京:中国农业出版社,2006.

[4] Zhang M, Li H L. First Report of *Hainesia lythri* Causing leaf spots of *Paeonia suffruticosa* in China[J]. *Plant Disease*, 2007, 91:636.

[5] 方中达.植病研究方法[M].3版.北京:中国农业出版社,1998.

[6] 奥斯伯 F M,金斯顿 R E,塞德曼 J G,等.精编分子生物学实验指南[M].4版.北京:科学出版社,2005:54-55.

[7] 王汉荣,茹水江,郭仁裕,等.浙江省长瓜炭疽病病原菌鉴定及其病原生物学特性研究[J].*浙江农业学报*, 2000, 12(2): 84-88.

[8] 李阜楸,喻子牛,何绍江.农业微生物学实验技术[M].北京:中国农业出版社,1996.

[9] 盖钧铭.试验统计方法[M].北京:中国农业出版社,2006.

参考文献

[1] Palm M E. *Pilidium concavum*-synonym of *Hainesia lythri*[J]. *Mycological Society of America Newsletter*, 1990 41(1): 32.

[2] Palm M E. Taxonomy and morphology of the synanamorphs *Pilidium*

微量点滴法测定植物提取物对绣线菊蚜的触杀作用

和玉华¹, 杨 婧¹, 谢雯颖¹, 和润喜²

(1. 西南林学院 保护生物学学院, 云南 昆明 650224 2. 西南林学院 资源学院, 云南 昆明 650224)

摘 要: 采用浸提法, 用 95% 的乙醇为溶剂, 提取得到竹柏、小花八角、单瓣狗牙花、灯台树、辣蓼等 5 种植物材料的提取物。将植物提取物稀释成 1、5、10 倍 3 个不同的浓度梯度, 用微量点滴法在室内对绣线菊蚜进行触杀作用的测定。结果表明: 触杀效果由高至低为: 辣蓼> 竹柏> 灯台树> 单瓣狗牙花> 小花八角。

关键词: 植物提取物; 绣线菊蚜; 微量点滴法; 触杀作用
中图分类号: S 436.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)04-0167-03

绣线菊蚜 (*Aphis citricola*) 属同翅目 (Homoptera), 蚜总科 (Aphidoidea), 是绣线菊、木瓜、李、杏等园林植物及果树的主要害虫^[1]。云南植物资源丰富, 该试验选取 5 种云南南部地区自然分布或人工种植比较广泛的植物, 研究这 5 种植物提取物对绣线菊蚜的杀虫活性, 为该害虫的无公害防治及植物资源的开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

第一作者简介: 和玉华 (1975-), 女, 云南丽江人, 硕士, 讲师, 现主要从事昆虫学及化学生态学的教学与研究工作。E-mail: heyuhua3@126.com。
基金项目: 云南省森林保护学重点学科建设经费资助项目 (500971)。
收稿日期: 2009-11-20

1.1.1 提取物的制备 供试植物材料及部位见表 1。将植物材料带回实验室, 用清水洗净晾干后, 放入烘箱中在 50~60℃ 条件下烘干 6~8 h, 用粉碎机粉碎, 过 40 目筛。用电子天平称取一定量的植物粉末, 将其分别放入广口标本瓶中, 加入约 3~4 倍的 95% 的乙醇浸泡, 期间换取 3 次乙醇, 第 1 次隔 3 d 换取 1 次乙醇, 第 2 次隔 2 d, 第 3 次隔 1 d 换取 1 次乙醇。收集 3 次浸出液, 过滤, 45℃ 下用旋转蒸发仪充分回收乙醇, 至植物提取液呈膏状为止。将已经回收过乙醇的植物提取液冷却后倒入分液漏斗中, 加入石油醚, 将其充分混合放置 0.5 h, 萃取植物提取液中的叶绿素, 25℃ 下用旋转蒸发仪回收萃取液中的石油醚。最后将膏状植物提取物装入褐色的试剂瓶中, 于 4℃ 冰箱内保存备用^[2]。
1.1.2 供试昆虫 绣线菊蚜采自昆明市昙华寺贴梗海棠 (*Chaenomeles lagenaria*) 和海桐 (*Pittosporum tobira*) 上, 经人工饲养若干代后待用。

Effects of Nutritional Factors and Culture Conditions on the Growth and Sporulation of *Pilidium concavum*

DUAN Ya-bing YU Zhen-zhen CHEN Yan-li KANG Ye-bin
(College of Forestry, Henan University of Science and Technology, Luoyang Henan 471003)

Abstract: In order to explore the effects of carbon, nitrogen, temperature, pH and light on the growth and sporulation of *Pilidium concavum* (Desm.) Hohn. Measured the mycelial growth with criss-cross and the sporulation by blood counting chamber. The results showed that the optimum grown was PDA, the optimum sporulation was PYA. The optimum grown temperature was 25℃, the optimum temperature for sporulation was 30℃. The optimum growth pH was 6, sporulation was a maximum of pH 11. Light had no significant effect on mycelial growth and sporulation. Glucose and yeast were the most suitable carbon and nitrogen sources for the growth of mycelia and sporulation.
Key words: *Pilidium concavum*; nutritional factors; culture conditions;