

粉红粘帚霉 67-1 厚垣孢子形成与贮存研究

董佩佩^{1,2}, 康 涛¹, 孙漫红², 李世东², 罗 明¹

(1. 新疆农业大学 农学院, 新疆 乌鲁木齐 830052; 2. 中国农业科学院 植物保护研究所/农业部作物有害生物综合治理综合性重点实验室, 北京 100081)

摘要:为研制粘帚霉生防制剂,以粉红粘帚霉 67-1 为材料,对粉红粘帚霉 67-1 厚垣孢子的生长过程、孢子结构、贮存介质和制剂含水量以及厚垣孢子和分生孢子的货架期比较进行了研究。结果表明:在特定的培养基中,粉红粘帚霉 67-1 在培养 24 h 后产生厚垣孢子,厚垣孢子形成于菌丝顶端或中部,并可以脱落游离到培养基中。电镜下可以看到圆形或椭圆形厚垣孢子以及加厚的细胞壁。相同贮存条件下,厚垣孢子的货架期比分生孢子长。低温条件下,10%含水量的贮存介质更利于厚垣孢子的贮存。

关键词:粉红粘帚霉;厚垣孢子;货架期;生物防治

中图分类号:S476+.1

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2013)10-0048-03

粘帚霉(*Gliocladium* spp.)是一种重要的土壤重寄生菌,能够寄生立枯丝核菌(*Rhizoctonia* spp.)和核盘菌(*Sclerotinia* spp.)等多种植物病原真菌^[1-2],具有生长快、产孢量大、寄主范围广、寄生能力强、拮抗机制多样等优点,粘帚霉作为一类重要的自然资源在植物病害生物防治上的应用已引起人们的重视^[3-5]。

目前,关于粘帚霉生物学、代谢产物、功能基因、发酵条件及防治病害的报道较多。在液体或者固体培养基中培养,粘帚霉可以形成厚垣孢子^[6]。研究表明,厚垣孢子在耐高温^[7]耐干燥^[8]及对土壤抑菌作用的抵抗力等方面优于分生孢子^[9-10],但对于厚垣孢子的形成以及结构,贮存的研究较少。

该研究通过对粉红粘帚霉 [*Clonostachys rosea* (syn *Gliocladium roseum*)] 67-1 厚垣孢子的形成、结构及贮存的研究,明确了厚垣孢子的形成过程、形态结构、贮存介质以及贮存条件,为粘帚霉生防制剂的研究提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

粉红粘帚霉 67-1 菌株是农业部作物有害生物综合治理综合性重点实验室从海南省乐东县菜

园豌豆地土样中经菌核诱捕获得并保存。厚垣孢子产生培养基为大米 100 g,蒸馏水 1 000 mL。分生孢子培养基为葡萄糖 30 g, NaNO₃ 2 g, K₂HPO₄ 1 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, KCl 0.5 g, FeSO₄·7H₂O 0.01 g。

1.2 方法

1.2.1 厚垣孢子的形成 将 67-1 菌株接种在 PDA 平板上,26℃培养 14 d,加入 5 mL 无菌水,洗脱孢子,制备浓度为 10⁸ 个·mL⁻¹ 的气生孢子悬液。取 2 mL 接种到装有 100 mL 大米培养基的三角瓶中(250 mL),26℃,180 r·min⁻¹ 振荡培养,每 8 h 取一次样,显微镜下观察菌体生长情况。

1.2.2 厚垣孢子的结构分析 将厚垣孢子悬液样品放入含有等体积的 4% 戊二醛中,室温固定 48 h,3 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,用磷酸缓冲液(pH 7.2)冲洗数次至没有戊二醛为止。锇酸固定 2 h,磷酸缓冲液清洗数次,样品经不同浓度的酒精(30、50、70、90、95 和 100% EtOH)逐级脱水(每级处理 15 min),之后用丙酮脱水、包埋、切片、染色,于 TEM 观察厚垣孢子的超微结构、细胞壁和细胞内容物。

1.2.3 厚垣孢子制剂货架期的研究 (1) 67-1 厚垣孢子与分生孢子的制备。将 67-1 菌株接种在 PDA 平板上,26℃培养 10~14 d,加入 10 mL 无菌水,洗脱孢子,制备成浓度为 10⁸ 个·mL⁻¹ 的孢子悬液,取 2 mL 分别接种到厚垣孢子培养基和分生孢子培养基中,26℃下摇床遮光振荡培养,转速 180 r·min⁻¹。培养 2 d 后,将发酵液用 300 目筛网过滤,分别得到 67-1 厚垣孢子和分生孢子悬液。(2) 粘帚霉厚垣孢子与分生孢子货架期的

收稿日期:2013-06-27

基金项目:国家“863”计划资助项目(2011AA10A205);国家“十二五”科技支撑计划资助项目(2012BAD19B01);行业技术体系资助项目(Nycyt35-gw29)

第一作者简介:董佩佩(1986-),女,河北省保定市人,在读硕士,从事植物病害生物防治研究。Email:peipeidong2006@163.com。

比较。分别将厚垣孢子和分生孢子悬液按 1:1 的比例与硅藻土混合,制成孢子含量大于 10^8 cfu \cdot g $^{-1}$ 的制剂,置于室温晾干至含水量分别为 5% 和 10%。放在磨口瓶中分别于 4℃ 和室温保存。分别取 1 g 厚垣孢子与分生孢子制剂于 9 mL 无菌水中,依次作系列稀释,取 100 μ L 涂布在加有硫酸链霉素和氨苄青霉素的 PDA 平板上,涂布。26℃ 培养 2 d,记录平板中的菌落数,检测制剂中的菌落浓度 (cfu \cdot g $^{-1}$), 分别在第 0、15、30、45、60、90、120、150 和 180 天取样。(3) 贮存介质的选择。贮存介质有 4 种,分别为硅藻土、硅藻土中加入 2% 褐藻酸钠、20% 甘油以及大豆油。将浓度为 10^8 个 \cdot mL $^{-1}$ 的孢子悬液按 1:1 比例与硅藻土混匀,室温晾干至含水量为 10%;同样的方法将孢子悬液与加入了褐藻酸钠的硅藻土 1:1 混匀,室温晾干至含水量为 10%;甘油和大豆油为介质的实验方法为,将孢子悬液离心,去除其中水分,分别用甘油和大豆油介质洗脱去除其中水分,混匀。以上处理均室温保存,分别在第 0、30、60、120 和 180 天检测制剂中存活的孢子数目。(4) 制剂含水量的选择。将厚垣孢子悬液与加有 2% 褐藻酸钠的硅藻土按 1:1 比例混匀,室温晾干至含水量为 5%、10% 和 15%。分别于 4℃ 和室温保存,并在第 0、30、60、120 和 180 天检测制剂中存活的孢子数目。

2 结果与分析

2.1 厚垣孢子的形成过程

接种 8 h 后,粉红粘帚霉 67-1 大部分孢子已萌发,并且菌丝已延长;培养 16 h 后,菌丝生长达到旺盛阶段,产生大量分支,有帚枝状孢子梗出现,在 3~4 个分枝上长出孢子,此时孢子只在菌丝顶端出现;培养 24 h 后,培养基中有大量游离的孢子,孢子壁较薄,孢子不成熟;培养 32 h 后,孢子数目有所增加,在菌丝中部会看到有厚垣孢子产生,且容易脱落,菌丝顶端也有厚垣孢子产生,孢子会游离到培养基中,这一时期已经没有帚枝状孢子梗;32 h 后厚垣孢子数目不再发生变化,但孢子壁加厚,孢子逐渐成熟。

2.2 厚垣孢子的结构

粉红粘帚霉 67-1 厚垣孢子大部分为圆形或椭圆形,直径 3~10 μ m。大多数孢子萌发时一端长出芽管,少数两端长出芽管。透射电镜观察可以看到粉红粘帚霉 67-1 厚垣孢子细胞壁加厚,原生质浓缩,孢内有许多内容物。孢子有一层白色内壁,且菌丝中没有此结构,推测其是在孢子形成

过程中,或者菌丝转化成孢子的过程中形成的,是孢子特有的结构,可能与孢子对外界环境的耐受性和货架期有关。

2.3 厚垣孢子贮存的研究

2.3.1 粘帚霉厚垣孢子与分生孢子货架期的比较

4℃ 条件下,在前 30 d,不同含水量两种孢子数目的下降速度都很慢,但 30 d 后,分生孢子数目快速下降,180 d 后,制剂中已经检测不到有存活的分生孢子,而厚垣孢子数下降 3 个数量级。室温条件下,两种孢子的贮存时间都比较短,尤其是含水量为 5% 时,经过 60 d,分生孢子的数量已经下降至 0。综合比较,同样条件下,厚垣孢子的货架期要比分生孢子长,低温条件更利于孢子货架期的延长。

2.3.2 贮存介质的选择 将粉红粘帚霉 67-1 的厚垣孢子置于不同介质中,制成两种粉剂,两种油剂,室温条件保存。由图 1 可知,在 120 d 前,厚垣孢子在粉剂中的货架期要比在油剂中的货架期长,第 180 天检测时,以硅藻土为介质的孢子数目为 10^2 cfu \cdot g $^{-1}$,20% 甘油和大豆油中活孢子数目为 10^3 cfu \cdot g $^{-1}$,而加有保护剂的硅藻土中活孢子数目为 10^5 cfu \cdot g $^{-1}$ 。由此推测,在硅藻土中加入一定量的保护剂能有效提高粉红粘帚霉 67-1 厚垣孢子的货架期。

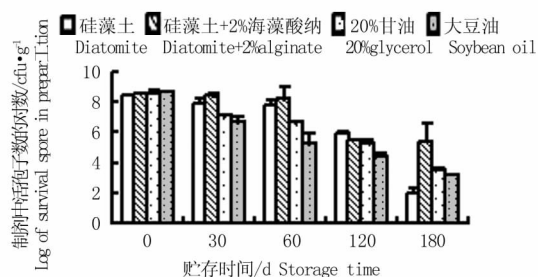


图 1 不同介质对粉红粘帚霉厚垣孢子制剂货架期的影响

Fig. 1 The effect of different medium on shelf life of *Clonostachys rosea* chlamydospores

2.3.3 制剂含水量的选择 将厚垣孢子悬液与加有保护剂褐藻酸钠的硅藻土 1:1 混匀,室温晾干至含水量为 5%、10%、15%,分别于 4℃ 和室温保存。由图 2 可知,在 4℃ 条件下,各种含水量的制剂中孢子存活率都比较高,但 10% 和 15% 含水量中孢子存活率要比含水量为 5% 的孢子存活率高。由图 3 可知,在室温条件下,高含水量和低含水量的制剂中孢子存活率都比较低,第 180 天检测时,10% 含水量的制剂中活孢子数目下降了 3 个数量级,而 5% 含水量制剂中活孢子数目下降了 5

个数量级,15%含水量制剂中活孢子数目下降了6个数量级。分析其原因,可能是在室温条件下,高含水量的孢子萌发,在初期一段时间内活菌数目没有明显变化,但菌丝得不到营养而死亡,因此在后期,制剂中的活孢数目急剧下降。综合比较,含水量为10%的制剂更利于粉红粘帚霉孢子的贮存。

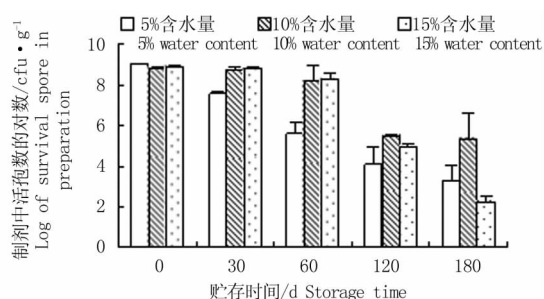


图2 4℃时不同含水量对粉红粘帚霉厚垣孢子制剂货架期的影响

Fig. 2 The effect of different water content on shelf life of *Clonostachys rosea* chlamydospores in 4°C

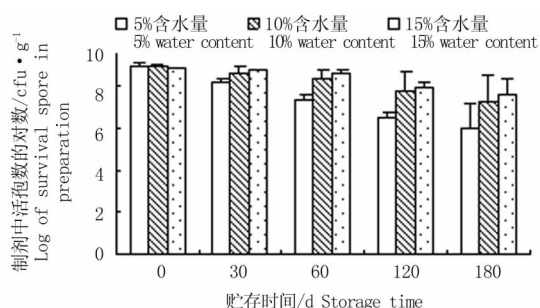


图3 室温下不同含水量对粉红粘帚霉厚垣孢子制剂货架期的影响

Fig. 3 The effect of different water content on shelf life of *Clonostachys rosea* chlamydospores in room temperature

3 结论

粉红粘帚霉 67-1 菌株是一株重要的生防菌,具有很高的生防潜力^[11]。其生长周期内可以产生3种繁殖体,包括菌丝体、分生孢子和厚垣孢子。厚垣孢子是在不良环境条件下形成的一种特殊的结构,一般由菌体细胞原生质收缩,外面包裹厚壁的一种有抵抗能力的孢子^[12]。该研究粉红粘帚霉 67-1 培养过程中先形成分生孢子,后形成厚垣孢子;分生孢子可以转变为厚垣孢子;厚垣孢子大多数为椭圆形;厚垣孢子串生或者单独形成,这与 Cliquet^[13]的研究结果一致。

货架期一直是制约生物农药的重要因子^[14],冯明光^[15]等人对球孢白僵菌研究时发现,高含水

量的活孢率在第3个月明显低于低含水量的处理,低温条件有利于孢子粉的贮存,常温下的安全保存期不超过6个月。这与该研究结果类似。含水量和温度都会对贮存中的孢子活力产生影响,主要表现为含水量影响孢内代谢的液相环境,而贮存温度影响孢子内部代谢速度,常温孢内营养物较快地被消耗而导致孢子衰竭。因此,合理选择生防真菌含水量和贮存温度对制剂的保存有重要意义。

参考文献:

- [1] Kubicek C P, Harmin G E. *Trichoderma and Gliocladium* [M]. Padstow Taylor and Francis Ltd. Press, UK; London, 1998: 193-200.
- [2] Sharma B K, Singh B M. Biological control of white rot of pea caused by *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib1) de Bary [J]. Journal of Biological Control, 1990, 4(2): 132-134.
- [3] 张拥华, 高会兰, 马桂珍, 等. 粉红粘帚霉 67-1 菌株寄生核盘菌研究[J]. 植物病理学报, 2004, 34(3): 211-214.
- [4] 暴增海, 吴雪仁, 杨文兰, 等. 粘帚霉 (*Gliocladium* spp.) 不同菌株对几种病原菌的抑菌作用测定[J]. 吉林农业大学学报, 2004, 26(4): 394-398.
- [5] 马桂珍, 高会兰, 张拥华. 链孢粘帚霉几丁质酶的诱导及其抗真菌活性研究[J]. 微生物学通报, 2007, 34(5): 905-908.
- [6] Lewis J A, Papavizas G C. Production of chlamydospores and conidia by *Trichoderma* spp. in liquid and solid growth media [J]. Soil Biology and Biochemistry, 1983, 15 (3): 351-357.
- [7] 李卫平, 王洪凯, 林福呈. 稻曲病菌厚垣孢子萌发特性研究[J]. 浙江农业学报, 2008, 20(4): 278-281.
- [8] 杨秀娟, 王舒婷, 甘林, 等. 稻曲病菌生长及其分生孢子萌发特性[J]. 福建农林大学学报, 2011, 40(6): 576-581.
- [9] Beagle-Ristaino J E, Papavizas G C. Survival and proliferation of *Trichoderma* spp. and *Gliocladium virens* in soil and in plant rhizospheres [J]. Phytopathology, 1985, 75 (6): 729-732.
- [10] 潘玮. 绿色木霉厚垣孢子与分生孢子生物学特性及生防效果的比较研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2006: 8-9.
- [11] 张拥华, 李世东, 王桂琴, 等. 粘帚霉可湿性粉剂防治大豆菌核病试验[J]. 植物保护, 2007, 33(5): 141-142.
- [12] Hughes S J. The term chlamydospore. In: Tadashi A, Tetsurō K (eds.) Filamentous microorganisms [M]. Japan Scientific Societies Press, Japan; Tokyo, 1985: 1-20.
- [13] Cliquet S, Ash G, Cother E. Production of chlamydospore and conidia in submerged culture by *Rhynchosporium mali-smatis*, a mycoherbicide of *Alismataceae* in rice cope [J]. Biocontrol Science and Technology, 2004, 14(8): 801-810.
- [14] 张丽靖, 冯明光. 基于球孢白僵菌的真菌杀虫剂生产工艺与剂型述评[J]. 浙江农业学报, 2004, 16(6): 395-399.
- [15] 冯明光, 应盛华. 不同含水量和温度下贮存中球孢白僵菌分生孢子活力与内贮营养的衰变[J]. 应用生态学报, 2002, 13(4): 439-443.