

文章编号: 1005-0906(2008)06-0108-03

氮饥饿对玉米大斑病菌生长和发育的影响

谷守芹¹, 范永山², 崔金旺³, 杨立恩²

(1.保定学院生物系, 河北 保定 071000; 2.唐山师范学院生命科学系, 河北 唐山 063000;

3.中国乐凯胶片股份有限公司品保部, 河北 保定 071054)

摘要: 以改良 Fries 合成培养基为基础, 观测氮饥饿胁迫条件下玉米大斑病菌菌株 01-11 和 03-22 在菌落生长速度、分生孢子产生时间和数量、菌落形态和颜色等方面的变化。结果发现, 在缺氮条件下, 培养 6 d 后菌落生长停滞, 颜色变淡; 菌丝稀疏, 老化程度加快; 分生孢子出现时间提前, 但产孢数量减少。研究结果说明, 氮元素对玉米大斑病菌的生长和发育有非常重要的作用。

关键词: 玉米大斑病菌; 氮饥饿; 生长发育

中图分类号: S435.131

文献标识码: A

Effects of Nitrogen Absence on the Growth and Development of *Exserohilum turcicum*

GU Shou-qin¹, FAN Yong-shan², CUI Jin-wang³, YANG Li-en²

(1. Biology Department of Baoding College, Baoding 071000;

2. Life Science Department of Tangshan Normal College, Tangshan 063000;

3. Quality Assurance Department of China Lucky Film Group Corporation, Baoding 071054, China)

Abstract: The colony morphology and growth speed, the conidia number and appearance time, and the mycelium color of *Exserohilum turcicum* (isolate 01-11 and 03-22) were studied on the improved Fries synthesis medium under the condition of nitrogen absence. The results had shown that after six days of nitrogen starvation, the mycelium growth was stopped, the colony color became darker, the mycelium biomass was reduced, the appearance time of conidia was promoted 2 – 3 days, but the conidia number decreased rapidly. It was proved that nitrogen played an important role on the growth and development of the corn pathogen.

Key words: *Exserohilum turcicum*; Nitrogen starvation; Growth and development

玉米大斑病菌 (*Exserohilum turcicum* Leonard et Suggs) 又称玉米大斑凸脐蠕孢, 属半知菌亚门真菌。由玉米大斑病菌引起的玉米大斑病 (Northern Corn Leaf Blight) 是世界各地玉米的重要叶部病害, 在我国主要分布在北方和高海拔山区等冷凉玉米种植区, 常造成严重的经济损失^[1]。近年来对玉米大斑病菌的研究主要集中在对其生理小种分化、HT- 毒素的纯化及结构分析、玉米抗大斑病基因的定位及分

子标记以及致病性的调控机制^[2~7]等方面。氮是菌丝中蛋白质、核酸、肽和氨基酸等的重要成分, 氮代谢对内生真菌和丛枝菌根(AM)真菌的孢子发育和侵染寄主都具有重要的功能^[8,9]。氮对玉米大斑病菌生长发育的影响还未见报道。

本研究以改良 Fries 培养基为基础, 通过观察玉米大斑病菌生活在氮源缺乏条件下的菌丝生长和孢子发育等方面的变化, 探讨氮元素在玉米大斑病菌生长发育中的作用, 为进一步研究氮在病菌的毒素代谢和致病性方面的作用提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

玉米大斑病菌菌株 01-11 和 03-22, 由河北农业大学真菌毒素实验室提供。

收稿日期: 2008-01-25

基金项目: 河北省科技厅博士基金项目(05547007D-2)

作者简介: 谷守芹(1967-), 女, 河北唐山人, 博士, 副教授, 主要从事分子植物病理学研究。E-mail: gushouqin@126.com
范永山为本文通讯作者。E-mail: fanyongshan@126.com

1.2 培养基

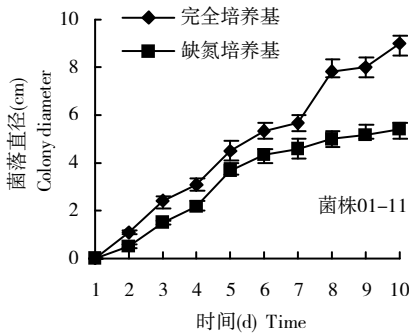
改良 Fries 完全培养基:蔗糖 60 g,酒石酸铵 10 g, 硝酸铵 2 g,KH₂PO₄ 2 g,MgSO₄·7H₂O 2.04 g,NaCl 2 g,CaCl₂ 0.506 g,酵母浸膏 1 g,琼脂 12 g,定容至 1 000 mL。

改良 Fries 缺氮培养基:蔗糖 60 g,KH₂PO₄ 2 g,MgSO₄·7H₂O 2.04 g,NaCl 2 g,CaCl₂ 0.506 g, 琼脂 12 g,定容至 1 000 mL。

1.3 菌落生长速度测定

首先将菌株接种至改良 Fries 完全培养基上, 25℃黑暗培养 10 d 左右,待菌落布满培养皿后,用 Φ=5 mm 的打孔器打取菌盘,之后将菌盘分别置于含有改良 Fries 完全培养基、缺氮培养基的培养皿中央。每种处理各设 5 个重复,在 25℃黑暗条件下培养,3 d 后用十字交叉法测量菌落直径,每隔 24 h 测量 1 次,取其平均值作为结果进行分析。

1.4 菌落形态和颜色观察



按照 1.3 的方法进行菌株培养,3 d 后观察并记录菌落的形态和颜色的变化,在 Leica 显微镜下观察菌丝形态、分生孢子产生时间及形态变化。

1.5 分生孢子产生数量的测定

在改良 Fries 完全培养基和缺氮培养基上培养玉米大斑病菌,从第 3 天到第 9 天,每天同一时间在每个培养皿中注入 5 mL 灭菌水悬浮孢子,在血球计数板上观察计数孢子数,并计算出每个菌落的产孢量。每个处理至少重复 5 次。

2 结果与分析

2.1 缺氮对玉米大斑病菌菌落生长速度的影响

将菌株 01-11 和 03-22 分别打菌盘至改良 Fries 完全培养基和缺氮培养基中进行培养。研究发现,玉米大斑病菌接种到 PDA 平板上 1~3 d 时有一个生长延滞期,3 d 后进入迅速生长期。测量不同培养时间的菌落直径,分析菌落的生长情况(图 1)。

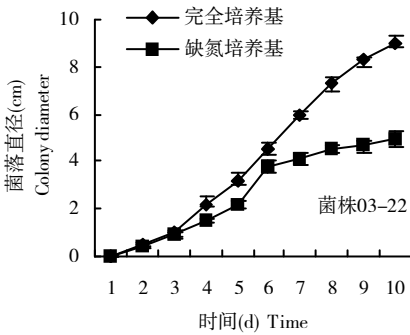


图 1 菌株在完全培养基和缺氮培养基中生长速度的比较

Fig.1 The growth speed comparison of *Setosphaeria turcica* in complete medium and N-free medium

从连续 8 d 的观测结果来看,菌株 01-11 和 03-22 呈现相同的生长趋势。在 3~5 d 完全培养基和缺氮培养基中菌落的生长速度基本一致;培养 6 d 以后,菌落在缺氮培养基中生长停滞,很可能由于缺氮培养基中氮元素营养供应不足,影响菌丝蛋白质、核酸等物质的合成,导致其生长速度减慢以致停止。

2.2 缺氮对玉米大斑病菌菌落形态和菌丝发育的影响

供试菌株 01-11、03-22 在完全培养基和缺氮培养基中,其菌落形态及菌丝发育情况不同(图 2)。在完全培养基中菌落边缘清晰,菌落中菌丝生长十分浓密,菌丝呈灰白色,菌丝生长旺盛。在缺氮培养基中,菌落边缘不整齐,菌丝生长稀疏,菌丝颜色深灰色,中央菌丝为灰黑色。在缺氮培养 4 d 后,显微观察菌落中有分生孢子形成,而在完全培养基中 7 d 后才能见到分生孢子形成。对分生孢子进行观察时

还发现,在完全培养基中的菌丝粘性较强,取出后不易和培养基分开,放在水中后也不容易分散。缺氮培养基中的菌丝之间粘性很低,很容易从培养基上分离下来。显微观察还发现,缺氮培养基中的菌丝细胞较完全培养基中的细胞短而宽,颜色较深。

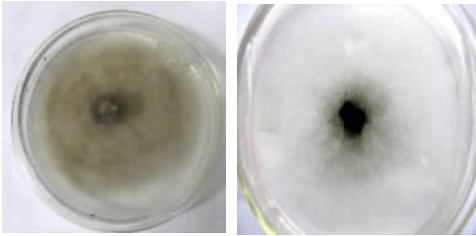


图 2 菌株 01-11 在完全培养基(左)和缺氮培养基(右)中菌落形态的比较

Fig.2 The colony morphology comparison of isolate 01-11 in complete medium(left) and N-free medium(right)

观察结果表明,氮元素缺乏对玉米大斑病菌的生长发育有很大影响,除了菌落的颜色发生明显改变以外,还出现菌丝老化加快、菌丝的粘性下降、菌丝生长密度减小等变化。

2.3 缺氮对玉米大斑病菌分生孢子产生的影响

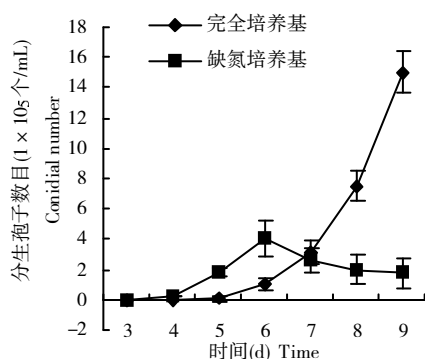


图3 菌株 01-11 在完全培养基和缺氮培养基中分生孢子数量的比较

Fig.3 The conidia number comparison of isolates 01-11 in complete medium(left) and N-free medium(right)

图3表明,在缺氮培养基中培养第4天时就开始出现分生孢子,并且分生孢子的数量迅速增加,到第6天时达到最高峰,然后开始下降;在完全培养基中第5天才开始出现分生孢子,在6d前增加速度较慢,然后迅速上升。出现以上现象的原因可能是由于缺氮条件下,玉米大斑病菌的产孢量受到了氮缺乏的显著影响,氮饥饿提前了玉米大斑病菌产孢的时间和前期数量,即氮饥饿加快了玉米大斑病菌的菌丝老化。

3 讨论

氮元素被称为生命元素,不仅因为它是合成蛋白质和核酸等生命物质不可缺少的元素,而且是合成一些重要信号物质所必不可少的。玉米大斑病菌在缺少氮源的情况下仍然能够生长,原因可能是接种时完全培养基中还有一些残存的氮元素,玉米大斑病菌利用这些氮元素进行生长;另外,由于氮元素是可再利用元素,老菌丝中的氮元素可以转移到幼嫩菌丝中供其生长发育,这种现象可能与植物体中氮元素的可重复利用有相同的生理机制。

有关真菌氮代谢方面的研究报道还很少,大都是围绕着氮代谢对真菌积累某种代谢物质的影响。庄惠如等^[10]发现在氮饥饿条件胁迫下,雨生红球藻

会在细胞内积累虾青素。吴桂芳^[11]等研究发现,在氮饥饿胁迫条件下,蓝细菌细胞内 β -羟基丁酸酯(PHB)含量会明显提高。曾杨等^[12]用氮饥饿补糖分批培养的方法培养小克银汉霉,可有效积累其细胞中的 γ -亚麻酸。杨艳等^[13]通过对谷氨酰胺产生菌NS611在氮饥饿条件下的代谢流进行分析后,得出氮饥饿可以使NS611中积累谷氨酰胺。玉米大斑病菌在氮缺乏条件下其体内代谢的改变还需要进一步探讨。

参考文献:

- [1] Perkins J M, Pederson W L. Disease development and yield losses associated with northern leaf blight on corn[J]. Plant Disease, 1987, 71: 940-943.
- [2] Ferguson L M, Carson M L. Spatial diversity of *Setosphaeria turcica* sampled from the eastern United States[J]. Phytopathology, 2004, 94(8): 892-900.
- [3] Zhangt L H, Dong J G, Wang C H, et al. Purification and Structural Analysis of a Selective Toxin Fraction Produced by the Plant Pathogen *Setosphaeria turcica*[J]. Agricultural Sciences in China, 2007, 6(4): 452-457.
- [4] Borchardt D S, Welt H G, Geiger H H. Genetic structure of *Setosphaeria turcica* population in tropical and temperates[J]. Phytopathology, 1998, 88(4): 322-329.
- [5] 李立家,宋运淳,鄢慧民,等.染色体定位两个与玉米大斑病抗性基因 *Ht1* 连锁的 RFLP 标记[J].植物学报,1998,40(12):1093-1097.
- [6] Fan Y S, Gu S Q, Dong J G, et al. Effects of MEK-specific inhibitor U0126 on the conidial germination, appressorium production, and pathogenicity of *Setosphaeria turcica*[J]. Agricultural Sciences in China, 2007, 6(1): 101-105.
- [7] 范永山,谷守芹,董金皋,等.特异性 MEK 抑制剂 U0126 对玉米大斑病菌孢子萌发、附着胞产生和致病性的影响[J].中国农业科学,2006,39(1):66-73.
- [8] 王金龙,高玉葆,任安芝,等.不同氮素营养条件下内生真菌感染对黑麦草光合和蒸腾速率及生物量的影响[J].植物学通报,2004, 21(5):539-546.
- [9] 朱红惠,姚青,龙良坤,等.不同氮形态对 AM 真菌孢子萌发和菌丝生长的影响[J].菌物学报,2004,23(4):590-595.
- [10] 庄惠如,卢海声,陈文列,等.雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis* Flotow)在胁迫条件下积累虾青素过程的超微结构研究[J].电子显微学报,2000,19(2):137-142.
- [11] 吴桂芳,吴庆余,沈忠耀.培养条件对蓝细菌生长及 PHB 积累的影响[J].清华大学学报(自然科学版),2001,41(6):30-33.
- [12] 曾杨,余龙江,朱敏,等.氮饥饿补糖分批培养小克银汉霉产 γ -亚麻酸的研究[J].生命科学研究,2004,8(1):86-88.
- [13] 杨艳,陈奎发,李春,等.谷氨酰胺产生菌 NS611 的代谢流研究分析[J].无锡轻工大学学报,2003,22(2):38-43.

(责任编辑:张英)