

糜子丝黑穗病病原菌鉴定及其生物学特性

吴恩果¹ 周瑜^{1,2} 朱明旗³ 刘佳佳¹ 高小丽¹ 冯佰利^{1*}

(1. 西北农林科技大学农学院, 旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 杨凌 712100; 2. 重庆市农业科学研究院, 重庆 400000; 3. 西北农林科技大学植物保护学院, 杨凌 712100)

摘要: 为明确陕西省糜子丝黑穗病病原菌种类及其生物学特性, 采用组织分离法和单孢分离法对其进行分离纯化, 通过形态学特征和 ITS 序列分析对其进行鉴定, 采用幼苗浸种法测定其致病性, 并于室内对其生物学特性进行研究。结果表明, 从发病糜子叶片和病瘿中共分离得到 6 株形态特征一致的菌株, 代表菌株 YL11-1 菌落呈酵母状, 白色, 厚垣孢子呈球形或近球形, 大小约 7~10 μm ; 菌株 YL11-1 的 ITS 序列 (GenBank 登录号为 KT721292.1) 与稷光孢堆黑粉菌 *Sporisorium destruens* 的相似性为 100%, 接种菌株 YL11-1 后糜子出现 4 种典型病症, 根据形态学特征、生物学特性和致病性分析结果将该病原菌鉴定为稷光孢堆黑粉菌。该菌株厚垣孢子萌发及菌丝最适生长温度范围均为 25~30 $^{\circ}\text{C}$, 最适产孢温度为 30 $^{\circ}\text{C}$; 厚垣孢子萌发和菌丝生长最适 pH 范围分别为 3~7 和 5~7, 最适产孢 pH 为 7; 厚垣孢子萌发最适碳源为 0.5% 葡萄糖和 1.0% 蔗糖, 该菌株对葡萄糖的利用效果最好, 对淀粉的利用效果最差; 菌丝生长和产孢最适氮源分别为硝酸钾和硫酸铵, 该菌株对硫酸铵的利用效果最差。

关键词: 糜子; 丝黑穗病; 病原菌; 稷光孢堆黑粉菌; 鉴定; 生物学特性

Identification and biological characteristics of *Sporisorium destruens* in broomcorn millet

WU Enguo¹ ZHOU Yu^{1,2} ZHU Mingqi³ LIU Jiajia¹ GAO Xiaoli¹ FENG Baili^{1*}

(1. State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas, College of Agronomy, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi Province, China; 2. Chongqing Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 400000, China; 3. College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi Province, China)

Abstract: In order to clarify the pathogens and biological characteristics of broomcorn millet smut occurred in Shaanxi Province, China, the pathogens were isolated with the methods of tissues isolation and single spore separation, the identification of pathogens was done with morphological characteristics and ITS sequence analysis. The pathogenicity was tested by soaking seeds, and biological characteristics were determined with crossing and haemocytometer method in the laboratory. The results showed the pathogen of broomcorn millet smut was *Sporisorium destruens* and six strains with the same morphological characteristics were isolated from the leaves and gall of infected broomcorn millets. The colony morphology of the representative strain YL11-1 was white with the shape of yeast, the chlamydo-spores of the pathogen were spherical or nearly spherical, about 7–10 μm in size. The ITS sequence of strain YL11-1 (accession No. KT721292.1) had 100% homology with that of *S. destruens*, after inoculation with strain YL11-1, broomcorn millets showed four typical symptoms, and the pathogen was identi-

基金项目: 国家现代农业(谷子高粱)产业技术体系(CARS-135-06-A26), “十二五”国家科技支撑计划(2014BAD07B03), 陕西省小杂粮产业技术体系项目(NYKJ-2018-YL1)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: fengbaili@nwsuaf.edu.cn

收稿日期: 2019-01-18

fied as *S. destruens*. The optimal temperature range for chlamyospore germination and mycelia growth were from 25°C to 30°C, and the optimal pH range were from three to seven and five to seven, the optimal sporulation temperature was 30°C, pH was seven. For chlamyospore germination, 0.5% glucose or 1.0% sucrose were the optimal carbon source, glucose was the optimum carbon source and starch was the worst; the optimum nitrogen sources for mycelial growth was potassium nitrate, for sporulation was ammonium sulfate, ammonium nitrate was the worst.

Key words: broomcorn millet; head smut; pathogen; *Sporisorium destruens*; identification; biological characteristics

糜子 *Panicum miliaceum* 抗旱、耐瘠、生育期短, 是干旱半干旱地区重要粮食作物, 也是保障粮食安全和种植业结构调整的优势作物(柴岩, 1999)。糜子丝黑穗病是糜子生产上的主要病害, 严重影响着糜子的产量和品质。致病菌厚垣孢子和菌丝的生物学特性与病害的流行和发病规律有着密切的关系(张佳星等, 2018)。不同病原菌的最佳生长温度、pH、碳氮源等不同, 因此明确糜子丝黑穗病病原菌种类及生物学特性, 可为糜子丝黑穗病的发生和流行的预测预报提供理论基础。

据报道糜子丝黑穗病病原菌有稷疣孢堆黑粉菌 *Sporisorium cenchr* 和稷光孢堆黑粉菌 *S. destruens* 两个种, 稷疣孢堆黑粉菌主要分布在中国、日本、西班牙、美国、墨西哥和巴西, 而稷光孢堆黑粉菌在世界各地广泛分布(郭林, 2000)。周瑜(2016)对来自我国糜子主产区的糜子丝黑穗病病原菌进行了遗传多样性分析, 结果表明我国稷光孢堆黑粉菌遗传变异程度不高, 遗传背景比较单一, 且菌株之间的遗传差异与地理距离之间无相关性。糜子丝黑穗病属系统侵染性病害, 苗期不发病, 直到抽穗后才表现出病症(Kovacs et al., 1997), 发病率一般在 5%~10% 之间, 高者可达 40%(刘惕若, 1984), 糜子发病后不能结实或部分结实, 部分结实的种子带菌, 即不能食用也不能正常萌发和生长。温度为 26~30°C、相对湿度为 80%~90% 的环境更有利于黑穗病菌厚垣孢子萌发(张文, 2017), 而高温高湿的环境则有利于菌丝入侵(李进秋和赵时峰, 2006)。除温湿度外, 营养物质也是影响厚垣孢子萌发和菌丝生长的重要因素(刘占山等, 2006; 张玉霞等, 2014)。

传统的病原菌鉴定主要依据菌落形态和孢子形状及大小等形态特征进行, 但同种病原菌形态具有较强的可变性, 仅根据形态难以鉴定其种类。随着电镜技术的发展, 扫描电镜被广泛应用于病原菌的鉴定(Cleary et al., 2013), 如章桂明等(2002)利用扫描电镜成功将小麦印度腥黑粉菌 *Tilletia indica* 与其

它近似种区分开来, 缩短了鉴定时间的同时, 提高了鉴定的准确性。另外, 随着分子生物学的发展, 以核酸为基础的聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 方法因其特异性强且准确性高, 能客观反应菌株的系统发育, 被广泛用于植物病原菌的检测(Chitrapalam et al., 2018)。ITS 是核糖体 DNA 的内转录间隔区域, 在大多数真菌中具有高度保守性, 能区分亲缘关系较近的菌种, 因此被广泛应用于分类学研究(Xing et al., 2018)。目前国内对糜子丝黑穗病的研究主要集中在糜子感病之后的生理生化响应、农艺性状和产量变化(张骥如飞, 2015; 周瑜, 2016)、杀菌剂筛选及糜子品种抗性鉴定方面(刘佳佳等, 2016), 关于糜子丝黑穗病发生发展规律及其病原菌鉴定和生物学特性的研究报道较少。

本试验拟采用组织分离法和单孢分离法对自陕西省西北农林科技大学试验田采集的发病糜子叶片和病穗进行病原菌分离, 通过形态学特征和 ITS 序列分析对其进行分类鉴定, 利用幼苗浸种法测定其致病性并对病原菌的生物学特性进行研究, 以期为该病发生和流行规律的研究提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

供试病样及植物: 2017年9月自陕西省西北农林科技大学试验田采集糜子丝黑穗病病穗, 将病穗阴干后碾碎过筛备用。对于没有病穗的植株, 采集发病糜子叶片, 带回实验室于 4°C 冰箱保存, 田间种植糜子品种及致病性试验糜子品种均为粘丰 5 号, 种子由山西省农业科学院提供。

培养基: 马铃薯葡萄糖 (potato dextrose agar, PDA) 培养基: 马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 12 g、蒸馏水 1 L; 查比克 (Czapek) 培养基: NaNO₃ 2 g、K₂HPO₄ 1 g、MgSO₄·7H₂O 0.5 g、KCl 0.5 g、FeSO₄·7H₂O 0.01 g、蔗糖 30 g、琼脂 15 g、蒸馏水 1 L; 马铃薯葡萄糖 (potato dextrose, PD) 液体培养基: 马铃薯

200 g、葡萄糖20 g、蒸馏水1 L。

试剂及仪器:PCR扩增试剂盒、DNA提取试剂盒、Buffer、dNTP、*Taq*,生工生物工程(上海)股份有限公司;其它试剂均为国产分析纯。PTC-100 PCR扩增仪,美国伯乐公司;DYY-6C电泳仪、SPX-250B-G恒温培养箱,北京六一仪器厂;ChemiDoc-It-UVP凝胶成像系统,美国UVP公司;S-3400N扫描电镜,日本日立公司;VORTEX 4漩涡混匀器,上海达姆实业有限公司;TL-2光照培养箱,广州莱思测试设备有限公司;CT 15 RE离心机,日本Hitachi Koki公司。

1.2 方法

1.2.1 糜子丝黑穗病病原菌的分离与形态学鉴定

选取具有簇叶状、刺猬头状、黑粉粒状病症的糜子叶片,采用常规组织分离法(方中达,1998)进行病原菌分离,待分离物产孢后,采用单孢分离法(董娟华等,2009)进行纯化;选取具有黑粉苞状病症的病穗,采用单孢分离法进行病原菌分离和纯化,将纯化菌株于-80℃冰箱保存。选取代表菌株进行后续研究。将待观察的菌株接种至PDA培养基上,置于30℃、相对湿度80%的恒温培养箱中全黑暗培养,培养7 d和21 d后拍照记录菌落形态,并在扫描电镜下观察培养21 d的分生孢子形态,将糜子丝黑穗病病原菌的厚垣孢子按康振生等(2004)方法制样后,于扫描电镜下观察其形态。

1.2.2 糜子丝黑穗病病原菌分子生物学鉴定

将待测菌株活化后转接到PD液体培养基中,于30℃、50 r/min、全黑暗条件下振荡培养10 d后采用十六烷基三甲基溴化铵(hexadecyl trimethyl ammonium bromide, CTAB)法提取菌株DNA,采用真菌通用引物ITS1(5'-TCCGTTAGGTGAACCTGCGG-3')和ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')进行PCR扩增。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。50 μL扩增体系:ddH₂O 41.55 μL、10×PCR Buffer 5 μL、10 mmol/L dNTP 1 μL、10 μmol/L ITS1、ITS4引物各0.6 μL、5 U/μL *Taq*酶0.25 μL、模板DNA 1 μL。PCR扩增程序:94℃预变性3 min;94℃变性45 s,52℃退火45 s,72℃延伸40 s,35个循环;72℃延伸10 min。用1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,PCR产物经纯化后送生工生物工程(上海)股份有限公司测序,将所得序列提交至GenBank登记并进行BLAST比对分析,根据GenBank中下载的15株相关病原菌ITS序列信息,利用PAUP 4.0软件采用邻接法构建系统发育树,进行1 000次重复检验。

1.2.3 分离物的致病性测定

将分离菌株接种至PDA平板上,30℃恒温黑暗培养21 d后,用灭菌刀片将菌丝刮取下来置于15 mL离心管中,加入无菌蒸馏水,将分生孢子悬浮液浓度调至 5×10^5 个/mL。取10 g糜子种子浸泡到100 mL分生孢子悬浮液中,以无菌蒸馏水作为对照,待种子萌芽后用无菌针头刺伤胚芽鞘,每个胚芽鞘刺伤6下,之后移栽到直径20 cm、高20 cm的塑料盆中,每盆移栽10株,置于白天温度28℃、夜间温度20℃、光照强度30 000 lx、光周期L 16:D 8、相对湿度80%的光照培养箱内培养60 d后拍照记录发病情况。试验重复3次。待接种的糜子植株发病后,根据柯赫氏法则,对接种后的病株进行再分离,观察分离菌株与原接种菌株性状是否一致。

1.2.4 糜子丝黑穗病病原菌的生物学特性

厚垣孢子悬浮液的制备:称取0.1 g糜子丝黑穗病病原菌厚垣孢子置于2 mL离心管中,加入1.5 mL灭菌蒸馏水,以4 000 r/min离心30 s,去上清液,加入1.5 mL灭菌蒸馏水,轻摇混匀。

温度对厚垣孢子萌发和菌丝生长及产孢的影响:取100 μL厚垣孢子悬浮液滴在载玻片上,置于相对湿度为80%,温度分别为20、25、30、35℃的恒温培养箱中全黑暗培养,培养2、4、6、8、10、12 d时统计萌发的厚垣孢子数量,计算萌发率,厚垣孢子萌发率=萌发的厚垣孢子数量/总厚垣孢子数量×100%。将纯化后的菌株接种到PDA平板上,30℃培养21 d后,用打孔器在菌落边缘打取直径为5 mm的菌饼,接种到PDA平板中央,置于相对湿度为80%,温度分别为10、15、20、25、30、35℃的恒温培养箱中全黑暗培养,培养21 d后采用十字交叉法测量菌落直径;取直径5 mm菌饼置于含有10 mL灭菌蒸馏水的15 mL离心管中,于漩涡混匀器上混匀,取1 mL置于血球计数板上,静置1 min后计数分生孢子量。每个处理重复3次。

pH对厚垣孢子萌发和菌丝生长及产孢的影响:分别用pH为3、5、7、9、11的盐酸溶液代替灭菌蒸馏水制备厚垣孢子悬浮液,取100 μL厚垣孢子悬浮液滴于载玻片上,置于温度为30℃、相对湿度为80%的恒温培养箱中全黑暗培养,培养2、4、6、8、10、12 d时统计萌发的厚垣孢子数量,计算萌发率。用1 mol/L HCl和1 mol/L NaOH将PDA培养基pH分别调至3、5、7、9、11,将纯化后的菌株接种到PDA平板上,30℃培养21 d后用打孔器在菌落边缘打取直径为5 mm的菌饼,分别接种到不同pH的PDA平板中

央,置于温度30℃、相对湿度80%的恒温培养箱中全黑暗培养,培养21 d后采用十字交叉法测量菌落直径,采用血球计数法统计分生孢子量。每个处理重复3次。

碳源对厚垣孢子萌发和菌丝生长及产孢的影响:分别用浓度为0.1%、0.5%、1.0%的葡萄糖溶液和蔗糖溶液代替灭菌蒸馏水制备厚垣孢子悬浮液,取100 μL厚垣孢子悬浮液滴于载玻片上,置于温度为30℃、相对湿度为80%的恒温培养箱中黑暗培养,培养2、4、6、8、10、12 d时统计萌发的厚垣孢子数量,计算萌发率。以Czapek培养基为基础培养基,以等质量的葡萄糖、可溶性淀粉分别置换Czapek培养基中的蔗糖制备不同碳源培养基,将纯化后的菌株接种到PDA平板上,30℃培养21 d后,用打孔器在菌落边缘打取直径为5 mm的菌饼,分别接种到不同碳源培养基上,置于温度30℃、相对湿度80%的恒温培养箱中全黑暗培养,培养21 d后采用十字交叉法测量菌落直径,采用血球计数法统计分生孢子量。每个处理重复3次。

氮源对菌丝生长和产孢的影响:由于氮源对厚垣孢子萌发影响的试验设置过多且试验结果不理想,故本研究仅分析氮源对菌丝生长和产孢的影响。以Czapek培养基为基础培养基,以含氮量相同的硝酸钾、硫酸铵、硝酸铵、尿素、天门冬氨酸分别置

换Czapek培养基中的硝酸钠制备不同氮源培养基,将纯化后的菌株接种到PDA平板上,30℃培养21 d后,用打孔器在菌落边缘打取直径为5 mm的菌饼,分别接种到不同氮源培养基上,置于温度为30℃、相对湿度为80%的恒温培养箱中全黑暗培养,培养21 d后采用十字交叉法测量菌落直径,采用血球计数法统计分生孢子量。每个处理重复3次。

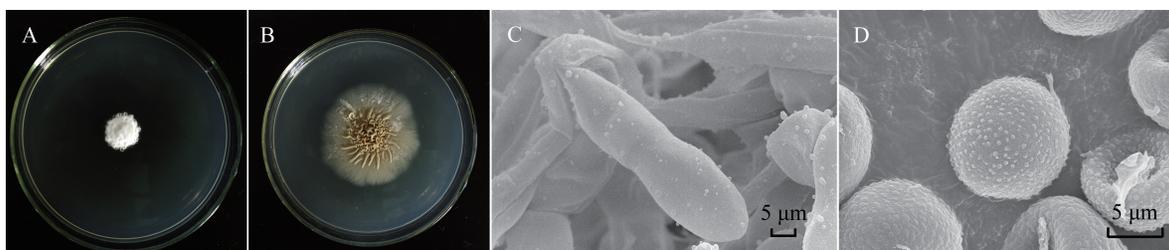
1.3 数据分析

采用SPSS 2.0进行数据统计分析,应用Duncan氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 糜子丝黑穗病原菌的分离和形态学鉴定

从发病糜子叶片和病穗上共分离获得6株菌株,分别编号为YL11-1~YL11-6,6株菌株的菌落形态及培养特性一致。以菌株YL11-1为代表进行研究。菌株YL11-1在PDA培养基上培养7 d时,菌落呈酵母状菌落,白色,表面隆起,较湿润,不透明(图1-A);培养21 d时,菌落褶皱增多,表面湿润,随着生长时间的延长,色素积累快,菌丝呈深褐色(图1-B);分生孢子呈纺锤形,分生孢子单个或多个侧生于菌丝旁边,大小约为22.4 μm×6.3 μm(图1-C);厚垣孢子呈球形或近球形,直径7~10 μm,表面有微小突起(图1-D)。



A: 培养7 d的菌落形态; B: 培养21 d的菌落形态; C: 分生孢子形态; D: 厚垣孢子形态。A: Colony morphology of cultivated for seven days; B: colony morphology of cultivated for 21 days; C: morphology of conidia; D: morphology of chlamydospores.

图1 菌株YL11-1在PDA培养基上的菌落形态及厚垣孢子形态

Fig. 1 Morphology of colony and chlamydospore of strain YL11-1 on the PDA medium

2.2 糜子丝黑穗病原菌的分子生物学鉴定

利用真菌ITS序列通用引物对菌株YL11-1的DNA扩增后获得大小约为800 bp的片段,将该ITS序列提交至GenBank,登录号为KT721292.1。将获得的ITS序列进行BLAST比对,菌株YL11-1与不同来源稷光孢堆黑粉菌ITS序列的同源性为100%。在所建立的系统发育树中,菌株YL11-1与稷光孢堆黑粉菌(登录号为AY344976.1)和稷光孢堆黑粉菌

(登录号为AF045871.1)的ITS序列聚到一个分支,而与孢堆黑粉菌属其它种的关系较远,与黑粉菌属的关系更远(图2)。根据菌株YL11-1的形态学特征以及分子生物学鉴定结果,最终将糜子丝黑穗病原菌鉴定为稷光孢堆黑粉菌。

2.3 分离物的致病性验证

糜子丝黑穗病原菌主要危害糜子穗部,发病糜子在抽穗期出现黑粉苞状、簇叶状、刺猬头状和黑

粉粒状4种典型田间病症。刺猬头状:丛生的叶卷曲形成刺猬头的形状(图3-A);簇叶状:叶小,坚挺,丛生(图3-B);黑粉苞状:孢子囊外被白色薄膜,厚垣孢子成熟时从孢子囊内散发出来,囊内仅剩残余的维管束组织(图3-C);黑粉粒状:部分籽粒被病原

菌侵染,被侵染的籽粒具有独立的孢子堆(图3-D)。接种菌株YL11-1后,糜子穗部出现了4种典型病症,其与田间病症一致,根据柯赫氏法则,对接种后的病株进行再分离,获得的菌株与原接种菌株性状一致,表明菌株YL11-1为糜子丝黑穗病病原菌。

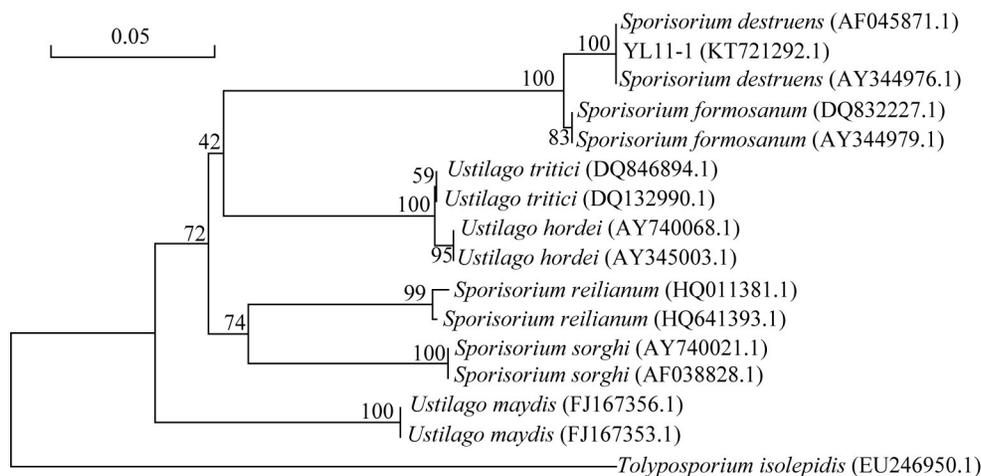
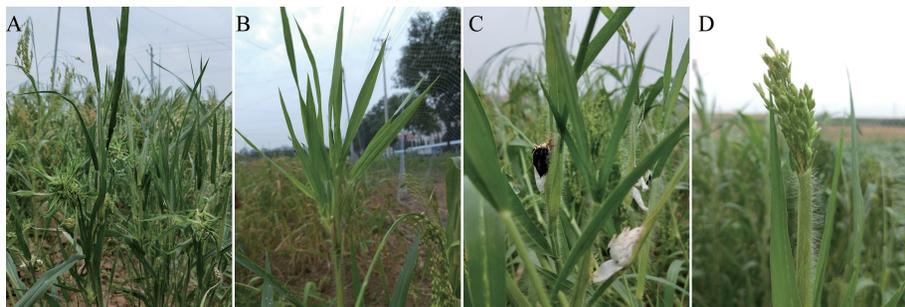


图2 基于rDNA-ITS序列采用邻接法构建菌株YL11-1及其相关菌株的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of strain YL11-1 and related fungi based on rDNA-ITS sequences by neighbor-joining method



A: 刺猬头状; B: 簇叶状; C: 黑粉苞状; D: 黑粉粒状。

A: Hedgehog; B: foliage; C: black powder; D: black grain.

图3 抽穗期糜子丝黑穗病的4种典型田间病症

Fig. 3 Four typical field symptoms of head smut at heading stage of broomcorn millet

2.4 糜子丝黑穗病病原菌的生物学特性

2.4.1 温度对厚垣孢子萌发和菌丝生长及产孢的影响

不同温度下,糜子丝黑穗病病原菌厚垣孢子萌发率符合S型生长曲线。当温度为25℃和30℃时,厚垣孢子萌发率趋于稳定,此时萌发率分别为75.29%和76.81%,两者之间差异不显著,但均显著高于20℃和35℃时的厚垣孢子萌发率($P < 0.05$,图4-A)。在10~30℃范围内,菌株YL11-1均能生长,当温度为5℃时,菌丝生长较缓慢,当温度为35℃时,菌丝停止生长,当温度为25℃和30℃时,菌落直径较大,分别为44.00 mm和43.67 mm,且两者之间差异不显著;但温度为30℃时的产孢量最大,为 2.66×10^7 个/mL,显著高于其它处理($P < 0.05$,图5-

A)。表明糜子丝黑穗病病原菌厚垣孢子萌发及菌丝生长的适宜温度范围为25~30℃,30℃比较适宜产孢。

2.4.2 pH对厚垣孢子萌发和菌丝生长及产孢的影响

pH对糜子丝黑穗病病原菌厚垣孢子萌发的影响显著,碱性条件不利于厚垣孢子萌发。当pH为11时,厚垣孢子的萌发率最低,接近0,当pH为7时,厚垣孢子萌发率最高,为71.46%,与pH为3和5时的厚垣孢子萌发率差异不显著,但显著高于pH为9、11时的厚垣孢子萌发率($P < 0.05$,图4-B)。pH在3~11范围内,菌株YL11-1可以生长和产孢,但过碱性或过酸性的环境会抑制菌丝生长和产孢。当pH为5和7时,菌落直径较大,分别为42.00、45.00 mm,两

者之间差异不显著,但均显著高于其它处理($P < 0.05$),但pH为7时产孢量最大,为 2.24×10^7 个/mL,显著高于其它处理($P < 0.05$,图5-B)。表明糜子丝

黑穗病病原菌厚垣孢子萌发及菌丝生长的最适pH范围为3~7和5~7,最适产孢pH为3。

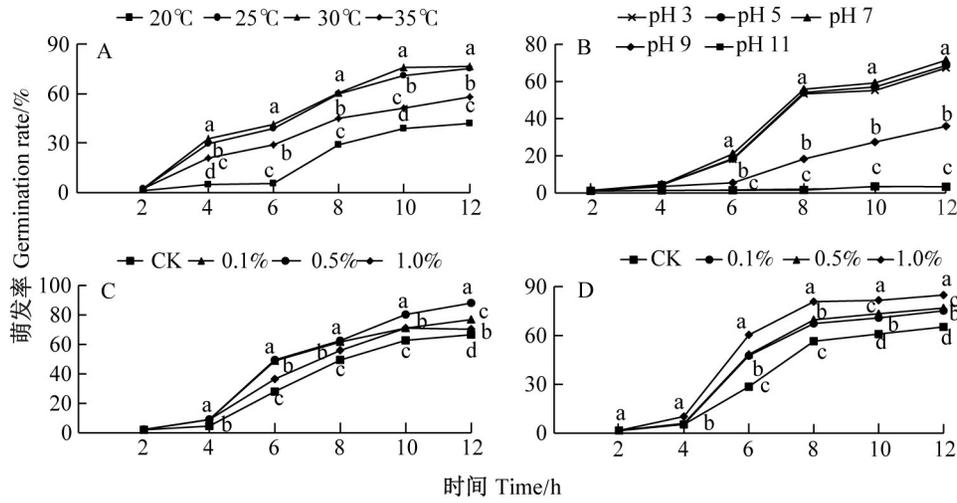


图4 温度(A)、pH(B)、葡萄糖(C)和蔗糖(D)对糜子丝黑穗病病原菌厚垣孢子萌发的影响

Fig. 4 Effects of temperature (A), pH (B), glucose (C) and sucrose (D) on chlamydospores germination of broomcorn millet head smut pathogen

图中数据为平均数±标准差。不同字母表示经Duncan氏新复极差法检验在 $P < 0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SD. Different letters indicate significant difference at $P < 0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

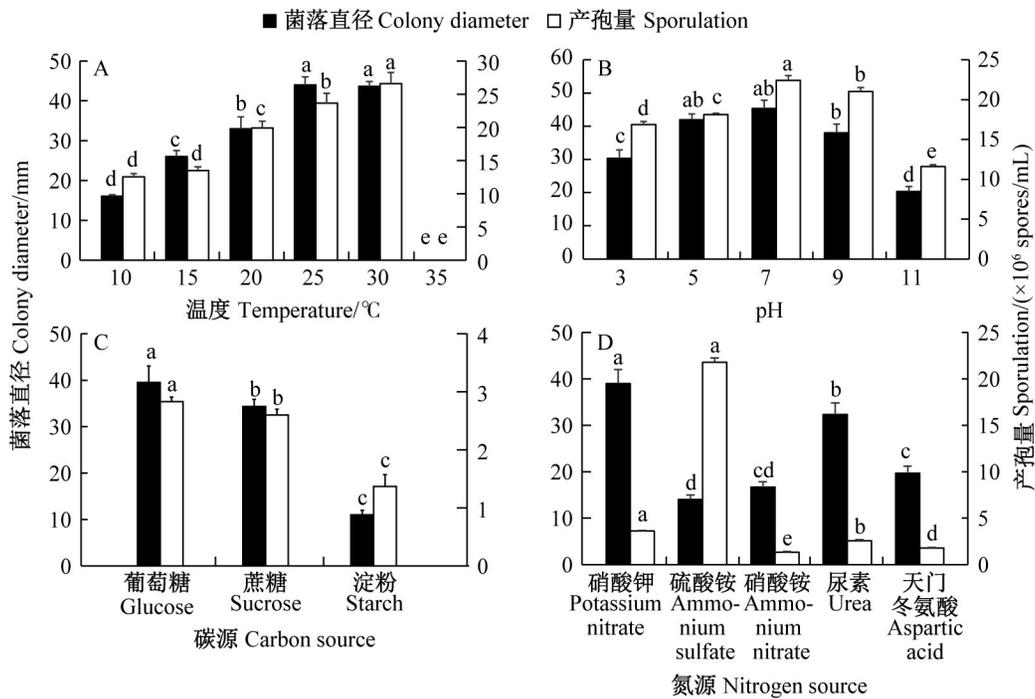


图5 温度(A)、pH(B)、碳源(C)和氮源(D)对糜子丝黑穗病病原菌菌株YL11-1菌丝生长及产孢的影响

Fig. 5 Effects of temperature (A), pH (B), carbon source (C) and nitrogen source (D) on the mycelial growth and sporulation of strain YL11-1

图中数据为平均数±标准差。同色柱不同字母表示经Duncan氏新复极差法检验在 $P < 0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SD. Different letters on the same color bars indicate significant difference at $P < 0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

2.4.3 碳源对厚垣孢子萌发和菌丝生长及产孢的影响

葡萄糖溶液和蔗糖溶液处理均能显著促进糜子

丝黑穗病病原菌厚垣孢子萌发。葡萄糖和蔗糖各浓度处理的厚垣孢子萌发率均显著高于蒸馏水处理的

厚垣孢子萌发率($P<0.05$),当葡萄糖浓度为0.5%时,厚垣孢子萌发率最高,为88.06%,当蔗糖浓度为1.0%时,厚垣孢子萌发率最高,为84.82%(图4-C~D)。菌株YL11-1在3种碳源培养基上的菌落直径和产孢量差异显著,其中在以葡萄糖为碳源的培养基上菌落直径和产孢量最大,分别为39.00 mm和 2.80×10^6 个/mL,而在以淀粉为碳源的培养基上菌落直径最小,产孢量也最少(图5-C)。

2.4.4 氮源对菌丝生长及产孢的影响

不同氮源对菌株YL11-1的生长及产孢影响显著。在以硝酸钾为氮源的培养基上菌落直径为39.00 mm,显著高于其余处理($P<0.05$),但产孢量仅为 3.60×10^6 个/mL;在以硫酸铵为氮源的培养基上菌落直径最小,仅为14.00 mm,但产孢量最大,为 2.18×10^7 个/mL,与以硝酸钾为氮源的培养基上的产孢量无显著差异,但均显著高于其它处理的产孢量($P<0.05$);在以硝酸铵为氮源的培养基上,菌株YL11-1的菌落直径为16.67 mm,显著低于除硫酸铵外的其它处理($P<0.05$),产孢量为 1.31×10^7 个/mL,显著低于其它处理($P<0.05$,图5-D)。

3 讨论

孢堆黑粉菌属真菌广泛存在于自然界中,该属真菌仅能在禾本科植物上寄生,使寄主发生黑穗病,(郭林,2000)。已报道该属真菌种类30种,主要引起玉米黑穗病(Kebebe et al., 2015)、小麦黑穗病(Kashyap et al., 2019)和水稻黑穗病(El-Kazzaz et al., 2015),鲜见其引起糜子丝黑穗病的研究报道。同属真菌的形态学特征及生理生化特性极为相似,需要结合多种方法对其进行准确鉴定,本研究采用形态学鉴定、分子生物学鉴定及致病性测定等方法明确了引起陕西省糜子丝黑穗病的病原菌为稷光孢堆黑粉菌。王云章(1963)通过扫描电镜观察发现稷光孢堆黑粉菌厚垣孢子呈圆球形或长圆形,大小约为7~10 μm ,深褐色,壁表有不明显的微细小刺,与本研究用电镜观察的稷光孢堆黑粉菌厚垣孢子形态一致。高粱黑穗病症状多样,一部分学者认为是由高粱黑穗病病原菌新产生的生理小种所致(Goodwin & Annis, 1991),另外一部分学者认为是由同属不同种的高粱黑穗病病原菌感染所致(Stoll et al., 2005)。姜钰等(2015)对田间表现不同症状的高粱黑穗病病原菌进行鉴定,发现引起高粱不同黑穗病病症的病原菌均是丝孢堆黑粉菌*S. reilianum*。本研究结果显示糜子丝黑穗病病原菌感染糜子后,糜子

植株也出现不同病症,但引起这些病症的病原菌均是稷光孢堆黑粉菌,可能是该病原菌的入侵导致糜子植株激素代谢紊乱,使正常的生理生化过程受阻,具体原因还需进一步研究。

Ghajar et al.(2006)研究结果表明燕麦叶斑病菌*Drechslera avenacea*的生长和产孢与温度、pH、营养元素等有关;徐蝉等(2012)研究结果表明美味黑穗病菌*Ustilago esculenta*厚垣孢子萌发和菌丝生长最适温度范围为25~30 $^{\circ}\text{C}$,低于15 $^{\circ}\text{C}$ 或者高于35 $^{\circ}\text{C}$ 均不利于厚垣孢子萌发、菌丝生长及产孢;本研究结果也显示,糜子丝黑穗病病原菌厚垣孢子萌发和菌丝生长最适温度均为25~30 $^{\circ}\text{C}$,温度超过35 $^{\circ}\text{C}$ 病原菌不再生长,但30 $^{\circ}\text{C}$ 最有利于其产孢。郑友涛(2016)报道低温且潮湿的环境有利于薹苡黑粉病菌*U. coicis*和玉米丝黑穗病菌*Sphacelotheca reiliana*的扩散及侵染;崔东辉(2014)认为,当病原菌侵入植株后,高温高湿的环境则更有利于玉米丝黑穗病菌的生长,造成病害的流行。陕西省夏季气温普遍偏高,且降雨较多,可能是糜子丝黑穗病流行和发展的重要原因之一。pH能显著影响玉米瘤黑粉病菌*U. maydis*和燕麦叶斑病菌厚垣孢子萌发、菌丝生长及产孢性,中性偏酸性条件有利于抑制这2种病原菌厚垣孢子萌发和菌丝生长,过酸性或过碱性条件严重影响这2种病原菌厚垣孢子萌发、菌丝生长和产孢(肖淑芹等,2011)。本研究结果发现糜子丝黑穗病病原菌厚垣孢子萌发的最适pH为3~7,菌丝生长最适pH为5~7,pH为7时产孢量达到最大,与肖淑芹等(2011)研究结果相似。

张玉霞等(2014)、谭语词和裴艳(2007)研究结果表明,葡萄糖可促进燕麦散黑穗病菌*U. avenae*厚垣孢子萌发,蔗糖则会抑制其萌发;而吴伟怀等(2010)认为葡萄糖和蔗糖均能促进甘蔗黑穗病菌*U. scitaminea*厚垣孢子萌发,但高浓度则会抑制其萌发;本研究也发现葡萄糖和蔗糖均能促进糜子丝黑穗病病原菌厚垣孢子萌发,且当葡萄糖和蔗糖浓度分别为0.5%和1.0%时萌发率最高。本研究结果与张玉霞等(2014)研究结果不一致的原因可能是不同病原菌对糖的种类以及浓度的需求不同且对糖的利用效率也不同。肖淑芹等(2011)发现玉米瘤黑粉病菌对葡萄糖、蔗糖的利用效果最好,对淀粉的利用效果最差;Małgorzata(2010)认为燕麦叶斑病菌对葡萄糖的利用效果最好;本研究结果也表明糜子丝黑穗病病原菌对葡萄糖的利用效果最好,且在以葡萄糖为碳源的培养基上产孢量也最大。肖淑芹等

(2011)研究结果表明玉米瘤黑粉病菌对天冬氨酸氮源利用较好,其次是硝酸钾,对硫酸铵利用效果最差,菌丝几乎停止生长;朱英芝等(2015)研究结果表明硫酸铵和硝酸铵对油茶炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides* 有明显的抑制作用;本研究结果表明以硝酸钾为氮源时菌株 YL11-1 菌丝生长较好,但产孢量较少,以硫酸铵为氮源时菌落直径小但产孢量最大,表明病原菌菌丝生长和产孢量的最佳氮源不同,其原因可能是不同病原菌对氮源的需求和利用效果不同。

本研究仅采集陕西省 1 个区域的糜子丝黑穗病病原菌,范围比较窄,不能完全代表糜子丝黑穗病病原菌其它菌株,在下一步工作中应增加采集地点,研究不同地区、不同寄主来源菌株的生物学特性,从而更好地为糜子黑穗病的发生和流行提供预测和预报。

参 考 文 献 (References)

- CHAI Y. 1999. Broomcorn millet. Beijing: China Agriculture Press, pp. 68–90 (in Chinese) [柴岩. 1999. 糜子. 北京: 中国农业出版社, pp. 68–90]
- CHITRAMPALAM P, ABRAHAM N, NELSON BD Jr. 2018. A culture-independent PCR-based assay to detect the root rot pathogen *Fusarium solani* species complex 11 from soybean roots and soil. *Plant Disease*, 102(2): 327–333
- CLEARY MR, DANIEL G, STENLID J. 2013. Light and scanning electron microscopy studies of the early infection stages of *Hymenocyphus pseudoalboidis* on *Fraxinus excelsior*. *Plant Pathology*, 62(6): 1294–1301
- CUI DH. 2014. Causes and prevention of corn smut. *New Agriculture*, (7): 27–28 (in Chinese) [崔东辉. 2014. 玉米丝黑穗病发病原因与防治. 新农业, (7): 27–28]
- DONG JH, LUO L, WANG CX, LENG WF, LI GF, LI BH. 2009. Isolating strongly parasitic fungi by single-spore isolation aided with capillary stiletto. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 25(3): 210–212 (in Chinese) [董娟华, 罗丽, 王彩霞, 冷伟锋, 李桂舫, 李保华. 2009. 一种强寄生病原真菌的分离方法: 毛细管打孔单孢分离法. 中国农学通报, 25(3): 210–212]
- EL-KAZAZ MK, SALEM EA, GHONEIM KE, ELSHARKAWY MM, NASR EL-KOT GAE, KALBOUSH ZAE. 2015. Integrated control of rice kernel smut disease using plant extracts and salicylic acid. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 48(8): 664–675
- FANG ZD. 1998. Research methods of plant diseases. 3rd edition. Beijing: China Agriculture Press, pp. 122–145 (in Chinese) [方中达. 1998. 植病研究方法. 第3版. 北京: 中国农业出版社, pp. 122–145]
- GHAJAR F, HOLFORD P, ALHUSSAEN K, BEATTIE A, COTHER E. 2006. Optimising sporulation and virulence in *Drechslera avenacea*. *Biocontrol Science and Technology*, 16(5): 471–484
- GOODWIN PH, ANNIS SL. 1991. Rapid identification of genetic variation and pathotype of *Leptosphaeria maculans* by random amplified polymorphic dna assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(9): 2482–2486
- GUO L. 2000. Chinese fungi: volume 12, Ustilaginaceae. Beijing: Science Press (in Chinese) [郭林. 2000. 中国真菌志: 第十二卷黑粉菌科. 北京: 科学出版社]
- JIANG Y, XU Q, XU XD, HU L. 2015. Identification of the pathogen population of sorghum smut with different symptoms in field. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 46(4): 404–409 (in Chinese) [姜钰, 徐婧, 徐秀德, 胡兰. 2015. 田间不同症状的高粱黑穗病病原菌种群鉴定. 沈阳农业大学学报, 46(4): 404–409]
- KANG ZS, HUANG LL, BUCHENAUER H, HAN QM, JIANG XL. 2004. Cytology of infection process of *Fusarium graminearum* on wheat spikes. *Acta Phytopathologica Sinica*, 34(4): 329–335 (in Chinese) [康振生, 黄丽丽, Buchenauer H, 韩青梅, 蒋选利. 2004. 禾谷镰刀菌在小麦穗部侵染过程的细胞学研究. 植物病理学报, 34(4): 329–335]
- KASHYAP PL, KUMAR S, TRIPATHI R, KUMAR RS, JASROTIA P, SINGH DP, SINGH GP. 2019. Phylogeography and population structure analysis reveal diversity by gene flow and mutation in *Ustilago segetum* (Pers.) Roussel *tritici* causing loose smut of wheat. *Frontiers in Microbiology*, 23(10): 35–41
- KEBEBE AZ, REID LM, ZHU X, WU J, WOLDEMARIAM T, VOLOACA C, XIANG K. 2015. Relationship between kernel dry-down rate and resistance to *Gibberella* ear rot in maize. *Euphytica*, 201(1): 79–88
- KOVACS J, KOPPANYI M, NEMETH N, PETROCZI I. 1997. Occurrence and prevention of head smut caused by *Sporisorium destruens* (Schlechtend) K. Vanky in millet. *Növénytermelés*, 46(4): 373–381
- LI JQ, ZHAO SF. 2006. Occurrence and control of corn smut. *Chinese Seed Industry*, (11): 48–49 (in Chinese) [李进秋, 赵时峰. 2006. 玉米黑粉病的发生流行与防治. 中国种业, (11): 48–49]
- LIU JJ, ZHOU Y, ZHANG PP, CHAO GM, ZHU MQ, FENG BL. 2016. Efficacy of fungicides for control of head smut (*Sporisorium destruens*) in broomcorn millet. *Acta Prataculturae Sinica*, 25(9): 132–141 (in Chinese) [刘佳佳, 周瑜, 张盼盼, 晁桂梅, 朱明旗, 冯佰利. 2016. 防治糜子丝黑穗病的杀菌剂筛选及田间防治效果研究. 草业学报, 25(9): 132–141]
- LIU TR. 1984. Black powder fungus and black powder disease. Beijing: China Agriculture Press (in Chinese) [刘惕若. 1984. 黑粉菌与黑粉病. 北京: 中国农业出版社]
- LIU ZS, REN XG, LI XS, ZHANG GL. 2006. Experimental studies on factors influencing germination of chlamydospores of rice kernel smut. *Journal of Henan University of Science and Technology: Natural Science*, 27(3): 65–67, 109 (in Chinese) [刘占山, 任新国, 李霞生, 张光利. 2006. 稻粒黑粉病菌孢子萌发的影响因素试验. 河南科技大学学报(自然科学版), 27(3): 65–67, 109]

- MAŁGORZATA C. 2010. Effects of culture conditions on the growth and morphology of 20 strains of *Drechslera avenae* (Eidam) Sharif. *Acta Agrobotanica*, 63(1): 149–160
- STOLL M, BEGEROW D, OBERWINKLER F. 2005. Molecular phylogeny of *Ustilago*, *Sporisorium*, and related taxa based on combined analyses of rDNA sequences. *Mycological Research*, 109(3): 342–356
- TAN YC, PEI Y. 2007. Preliminary report on germination of three kinds of smut of winter smut. *Modern Agriculture*, (5): 19 (in Chinese) [谭语词, 裴艳. 2007. 芦苇三种黑粉病菌冬孢子萌发试验初报. *现代农业*, (5): 19]
- WANG YZ. 1963. *China Ustilago*. Beijing: Science Press (in Chinese) [王云章. 1963. 中国黑粉菌. 北京: 科学出版社]
- WU HW, ZHENG XL, CHEN WJ, HE CP. 2010. The biological characteristics of the pathogen of sugarcane smut disease. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 31(8): 1388–1392 (in Chinese) [吴伟怀, 郑肖兰, 陈文坚, 贺春萍. 2010. 甘蔗黑穗病菌基础生物学特性. *热带作物学报*, 31(8): 1388–1392]
- XIAO SQ, JIANG XY, HUANG WD, ZHANG Y, WEI EQ, XUE CS, SHI J. 2011. Biological characteristics of *Ustilago maydis*. *Journal of Maize Sciences*, 19(3): 135–137 (in Chinese) [肖淑芹, 姜晓颖, 黄伟东, 张悦, 魏二琴, 薛春生, 石洁. 2011. 玉米瘤黑粉病菌生物学特性研究. *玉米科学*, 19(3): 135–137]
- XING HQ, MA JC, XU BL, ZHANG SW, WANG J, CAO L, YANG XM. 2018. Mycobiota of maize seeds revealed by rDNA-ITS sequence analysis of samples with varying storage times. *Microbiology Open*, 7(6): e00609
- XU C, ZHANG JZ, WANG XQ, WANG ZD, GUO DP. 2012. Research on factors influencing teliospore germination of *Ustilago esculenta*. *Journal of Changjiang Vegetables*, (16): 104–107 (in Chinese) [徐蝉, 张敬泽, 王晓清, 王志丹, 郭得平. 2012. 美味黑粉菌冬孢子萌发条件的研究. *长江蔬菜*, (16): 104–107]
- ZHANG GM, QI PK, ZHANG Z, YAO YJ. 2002. Comparative morphology of *Tilletia indica* and its related species. *Mycosystema*, 21(3): 412–418 (in Chinese) [章桂明, 戚佩坤, 章正, 姚一健. 2002. 小麦印度腥黑粉菌与近似种的形态学比较. *菌物学报*, 21(3): 412–418]
- ZHANG JRF. 2015. Identification of resistance and resistance mechanism to head smut in broomcorn millet. Master Thesis. Yangling: Northwest A&F University (in Chinese) [张骥如飞. 2015. 糜子黑穗病抗性鉴定与抗性生理研究. 硕士学位论文. 杨凌: 西北农林科技大学]
- ZHANG JX, LI L, DAI DJ, SHEN Y, ZHANG CQ. 2018. Biological characteristics and fungicide sensitivity of first reported *Phoma exigua* causing spot blight on *Atractylodes macrophala*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 48(5): 682–692 (in Chinese) [张佳星, 李玲, 戴德江, 沈瑶, 张传清. 2018. 白术枯斑病原菌鉴定、生物学特性及其对不同药剂的敏感性研究. *植物病理学报*, 48(5): 682–692]
- ZHANG W. 2017. Factors and control measures of corn smut. *Agricultural Technology Service*, 34(13): 87 (in Chinese) [张文. 2017. 玉米瘤黑粉病流行因素及防控措施. *农技服务*, 34(13): 87]
- ZHANG YX, ZHAO GQ, YAO T, WANG GJ, MA WW. 2014. Study on teliospore germination conditions of *Ustilago avenae* in oats. *Grassland and Turf*, 34(2): 33–38 (in Chinese) [张玉霞, 赵桂琴, 姚拓, 王国基, 马文文. 2014. 燕麦散黑穗病菌冬孢子萌发条件研究. *草原与草坪*, 34(2): 33–38]
- ZHENG YT. 2016. Occurrence and control of corn smut. *Plant Doctor*, (8): 61–62 (in Chinese) [郑友涛. 2016. 玉米丝黑穗病的发生与防治. *植物医生*, (8): 61–62]
- ZHOU Y. 2016. Genetic diversity of *Sporisorium destruens* and integrated management to control head smut in broomcorn millet. Ph. D Thesis. Yangling: Northwest A&F University (in Chinese) [周瑜. 2016. 糜子丝黑穗病菌遗传多样性及综合防控技术研究. 博士学位论文. 杨凌: 西北农林科技大学]
- ZHU YZ, LIAO WJ, ZOU DX, WU YJ, DENG Y. 2015. Identification and biological characteristics of the pathogen from *Camellia oleifera* anthracnose in Guangxi. *Journal of Plant Protection*, 42(3): 382–389 (in Chinese) [朱英芝, 廖旺姣, 邹东霞, 吴耀军, 邓艳. 2015. 广西油茶炭疽病原菌鉴定及生物学特性. *植物保护学报*, 42(3): 382–389]

(责任编辑:张俊芳)