

瓶式平板培养制备稻曲病菌薄壁分生孢子

蒲相君, 王忠文, 张丽丽, 张君成*

(广西大学农学院, 南宁 530004)

摘要 利用三角瓶装纳马铃薯琼脂培养基制备稻曲病菌薄壁分生孢子。结果发现, 瓶装培养基的体积与产孢量无关。各菌株在瓶式培养平板上均能正常形成后代孢子。瓶式培养比常规培养皿平板培养具有更高的产孢效率。产孢平板上产生的孢子收取后, 菌落继续培养, 新形成的孢子数量大幅下降。由于三角瓶能高效避免污染, 因而认为瓶式培养是制备稻曲病菌薄壁分生孢子的理想技术。

关键词 稻曲病菌; 薄壁分生孢子; 产孢; 瓶式培养

中图分类号: S 432.1 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2017323

Culture method with plate in flask for sporulation of thin-walled conidia of *Villosiclava virens*

PU Xiangjun, WANG Zhongwen, ZHANG Lili, ZHANG Juncheng

(College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530004, China)

Abstract A culture method with potato agar plate in flask (flask method) for sporulation of thin-walled conidia of *Villosiclava virens* was established. The results indicated that no relations existed between conidial yield and medium volume of the potato agar inside the flask. Conidia of new generation were formed normally by the flask method for all isolates examined. Efficiency of sporulation cultured by plate in the flask was higher than that by plate inside a common dish. Conidial yield of new generation was decreased greatly when a plate colony was cultured repeatedly after the conidia were moved out. It was concluded that the flask method was an ideal technique for sporulation culture of thin-walled conidia of *V. virens* due to the high efficiency of sporulation as well as anti-contamination.

Key words *Villosiclava virens*; thin-walled conidia; sporulation; culture method with plate in flask

病原真菌的孢子在植物真菌病害的发生与流行中发挥重要作用, 因而在植物病害研究中孢子的生长发育等生物学特征受到特别关注。在实验室对孢子进行恰当的培养, 不仅能探索孢子的相关生物学特征, 也能为研究工作提供直接的试验材料。稻曲病是国内外水稻生产的重大病害之一, 其病原菌 *Villosiclava virens* (Nakata) E. Tanaka & C. Tanaka 可产生子囊孢子、厚壁分生孢子和薄壁分生孢子三种形态的孢子^[1-2]。在田间该病菌可形成大量的厚壁分生孢子, 也容易形成可发育产生子囊孢子的菌核, 但在实验室内培养厚壁分生孢子存在相当大的技术困难, 也未见通过培养获得具产孢能力菌核的报道。目前, 通过培养较易获得的是稻曲病菌的薄

壁分生孢子, 因而在稻曲病的有关研究中, 使用的繁殖体材料主要是薄壁分生孢子^[3-5], 即便如此, 至今对薄壁分生孢子生长发育生物学的了解仍较为肤浅。已经发现, 液体培养稻曲病菌能产生大量的薄壁分生孢子, 因而长期以来国内外学者均习惯采用液体培养方法制备薄壁分生孢子^[6-8], 并将该方法用于产孢基因或致病相关基因研究^[9-10]。稻曲病菌在固体培养基上的产孢特性很少被关注, 也鲜有报道采用固体培养基制备薄壁分生孢子。作者在实际工作中发现, 稻曲病菌的薄壁分生孢子在 PSA 平板上萌发后, 初期生长的菌丝可形成大量新一代孢子, 培养 5~6 d 后可形成密集孢子的小菌落, 然而小菌落不断长出大量的非产孢菌丝, 逐步将原来的产孢小

收稿日期: 2017-08-26 修订日期: 2017-09-28

基金项目: 国家现代农业产业技术体系广西创新团队建设(nyeytxgxcxt-d-04-18-2); 广西自然科学基金(2011GXNSFA018068)

* 通信作者 E-mail: jczhang@gxu.edu.cn

菌落掩盖,表现出平板培养具有初期小菌落产孢的特点。而薄壁分生孢子在马铃薯琼脂(PA)平板上萌发,生长的产孢菌丝似乎可持续形成后代孢子,较少分化形成非产孢菌丝。长期以来,利用普通培养皿制备的平板进行病菌培养(皿式培养)几乎是国内外琼脂平板培养的默认标准,很少有利用三角瓶装纳琼脂进行固体培养(瓶式培养)的报道。试验发现,瓶式培养稻曲病菌同样能正常产孢,并表现出更高的产孢效率,有关的试验结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

稻曲病菌菌株 Uv-34、Uv-105、Uv-108、Uv-110、Uv-111 为广西大学植物病理学实验室保存菌株,均来自南宁市普通生产稻田采集的稻曲球分离。

1.2 方法

1.2.1 移植用孢子悬浮液的制备

从试管斜面保存的各菌株材料中取少量菌丝团移入 PS 培养液(马铃薯 100 g,蔗糖 10 g,蒸馏水 1 000 mL),置于摇床 150 r/min、28℃培养 7 d,然后用一层灭菌纱布过滤,除去菌丝体,将仅含孢子的液体离心沉淀,用无菌水将沉淀的孢子悬浮洗涤 1 次,重新离心收集沉淀,再用无菌水将孢子悬浮和稀释,并用血球计数板检测计数,最后用无菌水调配成浓度为 10^6 个/mL 的孢子悬浮液,分装于 5 mL 冷冻管,存于 25℃ 恒温箱备用。所用的 5 个菌株材料的备用孢子悬浮液的制备存贮时间不完全一样。

1.2.2 瓶式培养平板的制备

用马铃薯琼脂培养基 PA(马铃薯 100 g,琼脂 20 g,蒸馏水 1 000 mL)作为产孢培养基,常规高温高压灭菌。用 250 mL 三角瓶装纳 PA 制成瓶式培养平板,除注明外,每瓶装纳 30 mL。

1.2.3 菌体移植和产孢培养

于超净工作台上,将 1.2.1 制备的孢子悬浮液充分悬浮,用微量移液枪定量吸取孢子悬浮液,移植到 1.2.2 制备的瓶式培养平板上,用 T 形玻棒将孢子悬浮液均匀涂抹分散于平板面上,于 28℃ 下恒温培养。

1.2.4 培养基体积对产孢量的影响

将 20、40、60、80 mL PA 培养基分别装入 250 mL 三角瓶,制成瓶式培养平板,每个体积重复 3 瓶,统

一植入菌株 Uv-110 孢子悬浮液 50 μ L,28℃ 下产孢培养 5 d 后检测后代孢子形成数量。

1.2.5 不同培养方式对产孢量的影响

按 1.2.2 方法制备瓶式培养平板,同时用直径 9 cm 的培养皿制备常规培养平板。统一植入菌株 Uv-110 孢子悬浮液 80 μ L,转到 28℃ 恒温箱进行产孢培养,分别在培养 5、10、20、40 d 后检测后代孢子形成数量,3 个重复,比较瓶式培养与皿式培养的产孢量。

1.2.6 瓶式及培养皿培养的菌落再培养产孢表现

在瓶式培养平板及培养皿平板上分别植入菌株 Uv-111 孢子悬浮液 80 μ L,转到 28℃ 恒温箱进行产孢培养,5 d 后用无菌水及灭菌小毛刷洗涤、收集首次培养的后代孢子并检测孢子数量,随后,将瓶式培养平板及培养皿平板重新放入 28℃ 恒温箱进行第二次产孢培养,5 d 后用同样的方法洗涤、收集孢子,检测孢子数量,并按同样的方法进行第三次产孢培养,试验重复 3 次。

1.2.7 不同菌株在瓶式培养平板上的产孢表现

在瓶式培养平板上分别植入菌株 Uv-34、Uv-105、Uv-108、Uv-110、Uv-111 的孢子悬浮液 100 μ L,培养 5 d 后检测后代孢子数量,每菌株重复 2 瓶,观察不同菌株在瓶式培养中的产孢表现。其中菌株 Uv-111 孢子悬浮液已贮存 4 d,而菌株 Uv-34、Uv-105、Uv-108、Uv-110 的孢子悬浮液已贮存 123 d。

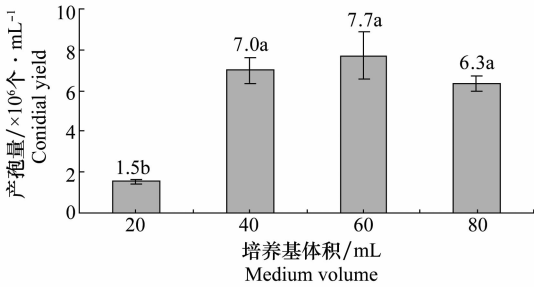
1.2.8 孢子数量检定

每瓶/皿平板加入无菌水 15 mL,用小毛刷刷下平板表面的孢子,用血球计数板计数,每重复瓶/皿观察 80 个中方格的孢子数,并换算成每毫升孢子液的孢子数量。

2 结果与分析

2.1 培养基体积对产孢量的影响

在三角瓶内装纳不同体积的培养基进行产孢培养,结果表明,20 mL 瓶式培养平板上孢子产量明显低于 40、60、80 mL 的处理,40、60、80 mL 处理的孢子产量处于较高的水平,但 3 个处理之间差异不显著(图 1),表明培养基达到一定体积后,增加培养基体积对产孢量没有显著影响。也暗示产孢量主要取决于平板面积,与平板厚度关系不大。后续试验瓶装量采用 30 mL,既保证培养基具有一定的厚度,也利于平板面积最大化。



不同字母表示差异显著, $P < 0.05$ (Duncan's 检验)。下同
Different letters indicate significant difference, $P < 0.05$ (Duncan's test). The same below

图 1 瓶式培养中培养基量对稻曲病菌产孢量的影响
Fig. 1 Effects of medium volume on conidial yield of *Villosiclava virens* cultured in flask

2.2 不同培养方式对产孢量的影响

稻曲病菌在瓶式培养和皿式培养两种方式下分别培养 5、10、20、40 d 后测定产孢量, 结果表明, 尽管在相同时间点, 瓶式培养与皿式培养的产孢量差异不显著, 但所测 4 个时点, 瓶式培养的产孢量均高于皿式培养(图 2), 体现出瓶式培养产孢较有优势。

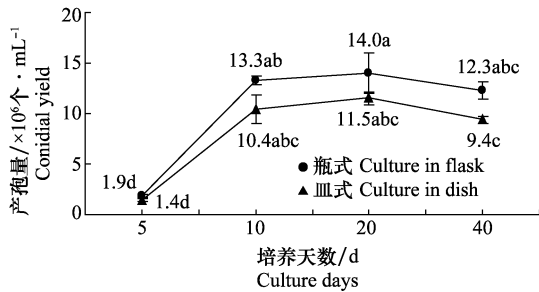


图 2 瓶式培养与皿式培养经历不同时间获得的稻曲病菌孢子产量

Fig. 2 Conidial yield of *Villosiclava virens* cultured in flask and in dish at different time points

2.3 瓶式及培养皿培养的菌落再培养产孢表现

首次培养 5 d 后, 瓶式平板上形成的孢子数量达 20.4×10^6 个/mL, 与皿式平板培养的产孢量差异显著; 洗脱并移去孢子, 将培养瓶重新放入培养箱中培养, 5 d 后, 新形成的孢子数量只有 2.7×10^6 个/mL; 重复洗脱、移去孢子后进行第 3 次培养, 新形成的孢子数量减少到 0.7×10^6 个/mL(图 3)。皿式平板重复再培养测试结果与瓶式平板培养基本一致(图 3), 表明产孢平板菌落重复培养再产孢, 新形成孢子数量呈大幅减少的趋势。

2.4 不同菌株瓶式培养的产孢表现

在瓶式培养平板上培养 5 d 后, 5 个菌株都能形成较多的后代孢子(图 4), 说明稻曲病菌在瓶式培

养平板上可普遍正常产孢。不同菌株后代孢子数量存在较大的差异是由于移植用的各菌株孢子贮备液中活性孢子数量不等, 该差异反映的不是菌株的产孢能力差异。

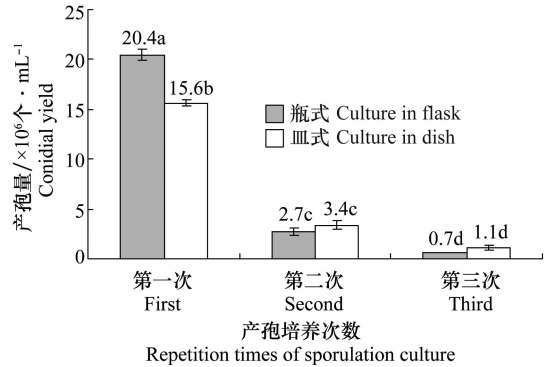


图 3 稻曲病菌平板菌落重复再产孢培养其孢子形成数量
Fig. 3 Conidial yield of a plate colony of *Villosiclava virens* cultured repeatedly

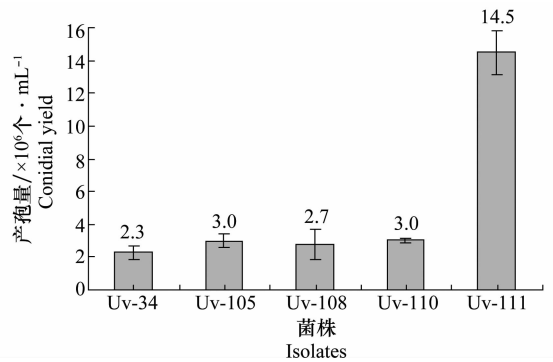


图 4 5 个稻曲病菌菌株经瓶式培养 5 d 的产孢量
Fig. 4 Sporulation of five *Villosiclava virens* isolates cultured for 5 days in flask

3 讨论

常规的平板产孢培养主要是采用培养皿, 极少见有报道采用三角瓶装琼脂平板的瓶式培养。本文用瓶式培养的方法进行稻曲病菌的产孢培养, 发现测试的菌株均可正常产孢(图 4), 对其中一个菌株进行 4 个时间段的产孢测试, 瓶式培养的产孢量总是高于皿式培养的产孢量(图 2), 考虑到瓶式平板面积(直径为 8 cm)比皿式平板面积(直径为 9 cm)更小, 相对而言, 瓶式培养表现出比皿式培养更高的产孢效率。三角瓶内部的微环境可能比培养皿内的环境更适宜产孢菌丝形成孢子。

当前实验室用的普通培养皿, 其皿底与皿盖间的缝隙可导致空气交换及螨虫出入通畅无阻, 很容易造成培养污染及试验失败。目前主要的解决方法

仍是利用 Parafilm 封口膜或其他胶膜将培养皿封口^[11-14],该方法的实践操作非常不便。而实验室用的普通三角瓶,其瓶塞可阻滤普通微生物的通过,尤其是当前已普遍使用硅胶橡皮塞,其阻滤效果更佳,因而三角瓶培养能高效避免污染。作者日常工作已采用三角瓶进行稻曲病菌的产孢培养,发现其确能长期并高效避免污染。显然,稻曲病菌的瓶式产孢培养相较于皿式培养具有较高的孢子产量,并且可防止污染,是薄壁分生孢子制备培养的理想方式,在需要获得无污染孢子的试验中,瓶式培养更突显其实用价值。实际上,瓶式产孢培养还具另一特点,就是后期洗涤收集孢子的操作更为方便。

用水洗涤、收集孢子后,培养平板面上的残液存在大量的孢子,这些残留孢子具有萌发和生长发育形成新的产孢菌落的能力,在适宜温度下再行培养,理应可再产生大量的新一代孢子,但实际测试并非如此。本文瓶式产孢培养初始植入孢子液 80 μL (浓度 1×10^6 个/mL),首次产孢培养 5 d 后,获得的后代孢子液达到 20.4×10^6 个/mL(图 3),移出洗涤孢子悬浮液后,平板面上的残留孢子液超过 80 μL ,这意味着第二次产孢培养的初始孢子数量超过首次培养初始孢子数量的 20 倍,但第二次产孢培养获得的后代孢子数量为 2.7×10^6 个/mL,未达首次产孢培养获得的后代孢子数量的 1/7,皿式培养结果也类似(图 3),而作者另外的试验发现,在琼脂平板上孢子萌发并生长发育形成的新一代孢子的数量与初始植入的孢子数量呈正相关。显然,在第二次产孢培养中,多数孢子不能正常萌发和形成新一代孢子,其原因值得关注。此现象也说明至今对薄壁分生孢子萌发及生长发育生物学的了解依然不够。不过,从实践工作角度看,本文结果表明用已收集孢子后的产孢平板菌落再行孢子制备培养,其实用价值不高。

本研究各菌株孢子贮备液的活性孢子数量不等,原因是各菌株备用孢子液的贮备时长各不相同。作者另外的试验已经明确,薄壁分生孢子在水中可存活,但存活率随贮存时间的延长而逐渐下降。因而尽管初始植入培养平板的贮备孢子液的体积相同,但具活力的孢子数量并不相同。

在培养基体积与产孢量的关系测试中,40、60 和 80 mL 3 个处理之间差异不显著,而 20 mL 处理比装入 40 mL 以上处理的产孢量大幅减少(图 1),原因可能与试验操作有关,因为三角瓶底内部通常为曲凸面,装入 20 mL 培养基时,中间部位的培养基较薄,收集后代孢子的刷洗操作容易破损培养基,因而采取轻

刷洗涤的保守操作,进而造成菌落上的孢子洗脱不充分。因此,用三角瓶进行孢子的制备培养,装入的培养基不宜过少。但考虑到培养基过多对提高产孢量并无明显增益,却大量消耗培养基,因而实际应用采取装入 30 mL 的折中处理,既保证培养基不易破损,也避免浪费。

参考文献

- [1] OU S H. Rice diseases [M]. 2nd ed. Slough, UK: Commonwealth Agricultural Bureaux, 1985: 307 - 311.
- [2] 张君成,陈志谊,张炳欣,等. 稻曲病菌的形态学观察研究[J]. 植物病理学报,2003,33(6):517 - 523.
- [3] ZHENG M T, DING H, HUANG L, et al. Low-affinity iron transport protein Uvt3277 is important for pathogenesis in the rice false smut fungus *Ustilagoideae vires* [J]. Current Genetics, 2017, 63: 131 - 144.
- [4] ZHENG D W, WANG Y, HAN Y, et al. UvHOG1 is important for hyphal growth and stress responses in the rice false smut fungus *Ustilagoideae vires* [J]. Scientific Reports, 2016, 6: 24824
- [5] 俞咪娜,陈志谊,于俊杰,等. 来源于同一穗不同稻曲球的稻曲病菌的致病性及遗传多样性[J]. 植物病理学报,2013,43(6):561 - 573.
- [6] YU J J, YU M N, NIE Y F, et al. Comparative transcriptome analysis of fruiting body and sporulating mycelia of *Villosiella vires* reveals genes with putative functions in sexual reproduction [J]. Current Genetics, 2016, 62: 575 - 584.
- [7] HAN Y Q, ZHANG K, YANG J, et al. Differential expression profiling of the early response to *Ustilagoideae vires* between false smut resistant and susceptible rice varieties[J]. BMC Genomics 2015,16: 955.
- [8] 王宇秋,李国邦,杨娟,等. 稻曲病菌侵染水稻颖花的酵母双杂交 cDNA 文库构建与应用[J]. 中国农业科学,2016,49(5):865 - 873.
- [9] LV B, ZHENG L, LIU H, et al. Use of Random T-DNA Mutagenesis in identification of gene UvPRO1, a regulator of conidiation, stress response, and virulence in *Ustilagoideae vires* [J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 2086.
- [10] 黄磊,俞咪娜,胡建坤,等. 稻曲病菌突变体 B-726 生物学性状分析及其 T-DNA 插入位点侧翼序列的克隆[J]. 中国农业科学,2013,46(16):3344 - 3353.
- [11] 戚仁德,汪涛,李萍,等. 安徽省辣椒疫霉交配型的分布及在无性后代的遗传[J]. 植物病理学报,2012,42(1):45 - 50.
- [12] 马国胜,高智谋. 烟草黑胫病菌培养性状的研究[J]. 中国农业科学,2007,40(3):512 - 517.
- [13] LEBOLDUS J M, BLENIS P V, THOMAS B R. A method to induce stem cankers by inoculating nonwounded *Populus* clones with *Septoria musiva* spore suspensions[J]. Plant Disease, 2010, 94(10): 1238 - 1242.
- [14] HU J, PANG Z L, BI Y, et al. Genetically diverse long-lived clonal lineages of *Phytophthora capsici* from pepper in Gansu, China [J]. Phytopathology, 2013, 103(9): 920 - 926.