

大豆茎溃疡病菌子囊孢子收集装置与方法探讨

苏筱雨, 李雯, 王婧, 李会平

(河北农业大学 林学院, 河北 保定 071000)

摘要: 获得大量干净的子囊孢子是检疫处理技术以及不同寄主抗病性测定的基础, 为此开发设计了一种收集大豆茎溃疡病菌子囊孢子的装置。结果表明: 使用该装置, 只需提前将子囊壳浸泡 10 min, 抽滤 3 min 即可得到大量干净的子囊孢子, 收集效率可达 1.01×10^2 个/子囊壳。

关键词: 大豆茎溃疡病; 子囊孢子; 收集装置; 方法

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

DOI: 10.11861/j.issn.1000-9841.2014.04.0619

Investigation on the Method and Device for Ascospores Collection of *Diaporthe phaseolorum*

SU Xiao-yu, LI Wen, WANG Jing, LI Hui-ping

(College of Forest, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, China)

Abstract: *Diaporthe phaseolorum* is a potential dangerous fungus to soybean. Obtaining big amount of ascospores is the basis of studies on quarantine treatment technology and resistance determination. In this study, a device for collecting ascospores of *D. phaseolorum* was developed. Using the device, perithecia were immersed for 10 min in advance, a lot of clean ascospores could be collected when filtering 3 min, and the collection efficiency reached to 1.01×10^2 per perithecia.

Key words: *Diaporthe phaseolorum*; Ascospores; Collection device; Method

大豆茎溃疡病(Soybean stem canker)主要由大豆北方茎溃疡病菌[*Diaporthe phaseolorum* (Cooke & Ellis) Sacc. var. *caulivora* Athow & Caldwell] (DPC) 和大豆南方茎溃疡病菌[*D. phaseolorum* (Cooke & Ellis) Sacc. var. *meridionalis* F. A. Fernandez] (DPM) 引起, 是为害大豆的重要病害^[1]。目前我国虽没有该病发生为害的报道^[2], 但从近年的检疫情况看, 所有进境大豆中都携带大量的豆秆、豆荚及其他杂质, 带菌的可能性很大, 在运输、加工和下脚料的处理等过程中都有传播扩散的可能, 且我国普遍具备该病菌定殖的条件。因此, 早在 2003 年, 该病就被有关专家列为大豆 7 种危险性真菌病害之一^[3-4]。

大豆茎溃疡病菌以菌丝和子囊壳在大豆植株及其残体上越冬, 为病害的初侵染源, 子囊壳抗逆性很强, 干燥 35 d 后子囊孢子仍能萌发^[5], 因此, 在该病害的检疫处理和防治工作中, 子囊孢子的灭活与否将是检疫处理是否彻底的重要指标, 在研究该病菌的检疫处理技术以及不同寄主抗病性测定等工作中都不可避免地需要获得大量干净的子囊孢子。

目前国外在收集子囊孢子时, 多采用自然放射法, 而国内仍采用传统方法, 即利用孢子的自然弹

射或用水洗, 这不仅难于控制, 而且收集的量也很有限, 同时无疑给利用孢子悬浮液进行孢子萌发试验增加了难度和工作量。本试验自行研制了一套大豆茎溃疡病菌子囊孢子的收集装置, 以期快速有效的收集大量干净的子囊孢子, 为检疫处理及防治工作奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株及其子囊壳 大豆北方茎溃疡病菌(*Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*, DPC), 编号为 60217, 购自 American Type Culture Collection (ATCC), 由河北农业大学林学院林木病理实验室提供。参照李会平等^[6]的方法进行大豆茎溃疡病菌子囊壳的诱导备用。

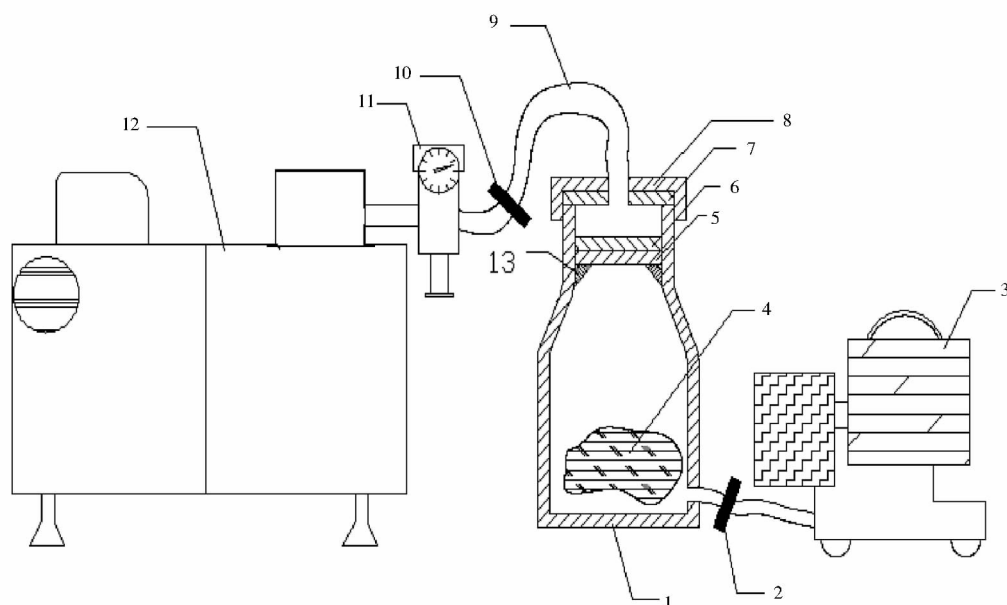
1.1.2 子囊孢子收集装置 大豆茎溃疡病菌子囊孢子收集装置由河北农业大学林学院林木病理实验室设计并提供。该装置包括真空泵、鼓风机和抽滤瓶 3 部分。其中抽滤瓶的瓶口具有瓶盖, 瓶盖与真空泵经排气管路相连, 抽滤瓶底部经送气管路与鼓风机相连, 在瓶盖下方固定有过滤网, 过滤网上面设有吸附膜(图 1)。

收稿日期: 2013-12-13

基金项目: 国家质检总局科技计划项目(2009IK264)。

第一作者简介: 苏筱雨(1981-), 女, 硕士, 实验师, 主要从事森林病虫害综合管理研究。E-mail: sxy8142477@163.com。

通讯作者: 李会平(1975-), 女, 博士, 副教授, 主要从事植物病害防治研究。E-mail: huipingli@sohu.com。



1:收集瓶;2:阀门;3:鼓风机;4:大豆秸秆;5:过滤网;6:吸附膜;7:密封垫;8:瓶盖;9:管路;10:阀门;11:压力表;12:真空泵;13:支架。

1. Filter bottle;2. Air supply switch;3. Blower;4. Soybean straw with perithecia;5. Filter screen;6. Adsorption film;7. Seal;8. Cap of filter bottle;9. Exhaust pipe;10. Switch of exhaust pipe;11. Piezometer;12. Vacuum pump;13. Support of adsorption film.

图1 大豆茎溃疡病子囊孢子收集装置

Fig. 1 Device for ascospores collection of *Diaporthe phaseolorum*

1.2 子囊孢子收集方法优化

1.2.1 子囊孢子收集 将带有成熟子囊壳的大豆秸秆用水浸泡后,放入抽滤瓶的底部,打开鼓风机鼓风,将子囊孢子吹起,同时打开真空泵,子囊孢子经过滤网净化后,被吸附膜所吸附,聚集在吸附膜上。取下吸附膜,将子囊孢子转移至盛有1 mL 蒸馏水的离心管中,混合均匀后,用血球计数板计数孢子浓度,计算收集效率。收集效率 = 收集孢子数/子囊壳。

1.2.2 子囊壳不同浸泡时间对子囊孢子收集效率的影响 剪取带有约20个子囊壳的大豆秸秆小段3段,分别用蒸馏水浸泡1,5,10,20,40 min后,放入抽滤瓶的底部,然后由鼓风机鼓风10 min,按1.2.1方法收集子囊孢子,计算收集效率。

1.2.3 不同抽滤时间对子囊孢子收集效率的影响

取浸泡10 min的带有约20个子囊壳的大豆秸秆小段3段,放入收集装置中,1 min后取下吸附膜,按1.2.1方法统计收集到的子囊孢子数,计算收集效率。然后再放入一张新的吸附膜,启动装置,于3 min时取下统计收集到的子囊孢子数。同样方法,分别统计5,10和15 min时收集到的子囊孢子数和收集效率。

2 结果与分析

2.1 不同浸泡时间下子囊孢子收集效率

带有子囊壳的大豆秸秆浸泡不同时间后,用上述装置收集子囊孢子,收集效率如表1所示。

表1 不同浸泡时间对子囊孢子收集效率的影响

Table 1 Effects of different immersion time on ascospore collection efficiency

浸泡时间 Immersion time/min	收集到的子囊孢子数 Collected ascospore number/ $\times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$	收集效率 Ascospore collection efficiency/ $\times 10^2$ per perithecia
1	0.02 c	0.033 c
5	0.69 b	1.150 b
10	0.90 a	1.500 ab
20	1.23 a	2.080 a
40	1.08 a	1.800 a

从表 1 可以看出,子囊壳浸泡不同时间明显影响子囊孢子的收集效率。浸泡 1min 时,子囊孢子收集效率最低,仅为 0.033×10^2 个/子囊壳;随着浸泡时间的增加,收集效率呈先增后降低的趋势,于浸泡 20 min 时,收集到的子囊孢子量最多,但浸泡 10 min 与浸泡 20 和 40 min 时差异不显著。因此,在采用此装置进行子囊孢子的收集时,子囊壳浸泡 10 min 即可得到较大释放量的子囊孢子。

2.2 不同抽滤时间对子囊孢子收集效率的影响

浸泡处理 10 min 的子囊壳放入此装置中,采用

不同抽滤时间收集子囊孢子(表 2)。结果表明:收集装置抽滤 1 min 时,平均每个子囊壳仅收集到 0.30×10^2 个孢子,大量的子囊孢子集中在抽滤 3 min 时被收集到,之后,收集到的孢子数量急剧下降,5 min 时平均每个子囊壳仅收集到 0.10×10^2 个孢子,5 min 以后吸附膜上几乎收集不到子囊孢子。因此,在采用该装置进行子囊孢子的收集时,抽滤 3 min 即可收集到绝大多数的子囊孢子。

表 2 不同抽滤时间对子囊孢子收集效率的影响

Table 2 Effects of different filtration time on ascospore collection efficiency

	抽滤时间 Filtration time/min				
	1	3	5	10	15
收集到的子囊孢子数 Collected ascospore number/ $\times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$	0.18	0.61	0.06	0	0
子囊孢子收集效率 Ascospore collection efficiency/ $\times 10^2$ per perithecium	0.30	1.01	0.10	0	0

3 结论与讨论

本试验采用自行研制的大豆茎溃疡病菌子囊孢子收集装置,将子囊壳浸泡 10 min,抽滤 3 min 即可得到大量干净的子囊孢子,收集效率可达 1.01×10^2 个/子囊壳。该装置及方法对于其他可在寄主组织上产生大量子实体的病原真菌,具有一定的参考价值。但对于其他病原真菌的浸泡及抽滤时间还需进一步试验研究。

参考文献

[1] Pioli R N, Morandi E N, Martinez M C, et al. Morphologic, molecular, and pathogenic characterization of *Diaporthe phaseolorum* variability in the core soybean-producing area of Argentina[J]. *Phytopathology*, 2003, 93(2): 136-146.

[2] 王颖, 杨伟东, 陈枝楠, 等. 大豆茎溃疡病菌的生物学特性及其传入我国的风险[J]. *植物检疫*, 2009, 23(1): 23-25. (Wang Y, Yang W D, Chen Z N, et al. Biological characters and the risk of introduced into China of *Diaporthe phaseolorum*[J]. *Plant Quarantine*, 2009, 23(1): 23-25.)

[3] 吴品珊, 严进. 值得关注的大豆新病害[J]. *植物检疫*, 2003, 17(4): 226-228. (Wu P S, Yan J. The new soybean diseases of concern[J]. *Plant Quarantine*, 2003, 17(4): 226-228.)

[4] 顾建锋, 张建成, 徐瑛, 等. 大豆茎溃疡病的研究进展及其检疫意义[J]. *植物检疫*, 2006, 20(4): 231-233. (Gu J F, Zhang J C, Xu Y. Research progress and quarantine significance of soybean stem canker[J]. *Plant Quarantine*, 2006, 20(4): 231-233.)

[5] Backman P A, Weaver D B, Morgan-Jones G. Soybean stem canker: An emerging disease problem[J]. *Plant Disease*, 1985, 69: 641-647.

[6] 李会平, 诗情, 王凯, 等. 大豆茎溃疡病菌子囊壳诱导及孢子萌发方法探索[J]. *植物病理学报*, 2012, 42(4): 436-439. (Li H P, Shi Q, Wang K, et al. Method of the perithecium producing and ascospore germination of *Diaporthe phaseolorum*[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2012, 42(4): 436-439.)