

北美大豆猝死综合症病菌厚垣孢子的液体培养条件

师情¹,李会平¹,黄大庄¹,郭成亮²,苏筱雨¹

(1. 河北农业大学 林学院, 河北 保定 071000; 2. 秦皇岛出入境检验检疫局, 河北 秦皇岛 066002)

摘要:用液体培养的方法,研究培养基、pH值、温度以及氧气等因素对北美大豆猝死综合症病菌(*Fusarium virguliforme* sp. nov.)菌株 F-171 厚垣孢子产生的影响。结果表明:菌株 F-171 产生厚垣孢子的最适液体培养条件为 7 500 r·min⁻¹、2 min 匀浆断裂菌丝,在 250 mL 三角瓶装入 80 mL 大豆茎秆或豆芽汁培养液,在 pH 6, 25~30℃ 下,以 120 r·min⁻¹ 振荡培养。最佳液体培养条件下的产孢曲线表明,随培养时间的延长,厚垣孢子产量逐渐增加,10 d 后产量最高,达到 3.15×10⁵ 个·mL⁻¹。

关键词:北美大豆猝死综合症病菌;厚垣孢子;液体培养条件

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2011)05-0813-05

Producing Conditions of Chlamyospore of *Fusarium virguliforme* sp. nov. in Liquid Culture

SHI Qing¹, LI Hui-ping¹, HUANG Da-zhuang¹, GUO Cheng-liang², SU Xiao-yu¹

(1. Forest College of Hebei Agricultural University, Baoding 071000, Hebei; 2. Qinhuangdao Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qinhuangdao 066002, Hebei, China)

Abstract: The effects of culture medium, pH, temperature and oxygen on the chlamyospore production of *Fusarium virguliforme* sp. nov. strain F-171 were studied by liquid culture method. The results showed that, the best liquid culture conditions for the chlamyospore production of the strain F-171 were, homogenized hyphae at 7500 r·min⁻¹ for 2 min, filled 80 mL liquid culture of soybean stem or sprout juice in the 250 mL flask, and incubated at pH 6, 25-30°C and 120 r·min⁻¹ shaking cultivation environment. Chlamyospore production curve in the best liquid culture conditions showed that the number of chlamyospore increased gradually with prolonging of the incubation time, reached the peak (3.15×10⁵ spores·mL⁻¹) 10 days after incubation.

Key words: *Fusarium virguliforme* sp. nov.; Chlamyospore; Culture condition

北美大豆猝死综合症病菌 *Fusarium virguliforme* sp. nov. (原名 *F. solani* f. sp. *glycines*) 属于半知菌亚门、镰刀菌属,能侵染大豆引起大豆猝死综合症,给大豆生产造成严重危害^[1-5]。主要分布在美国、加拿大、阿根廷等几个大豆主产国^[6-8],目前我国尚未有该病的发生^[9]。该病菌产生的厚垣孢子细胞壁较厚,能在土壤和根部残屑中越冬,是主要的初侵染源^[10-12]。近几年我国从美国等大豆疫区进口大豆数量很大,而这些进口大豆中经常夹带土壤和病残体,使该病菌有传入我国的潜在风险,因此是我国重要的对外检疫性有害生物之一^[13-15]。在辐射、熏蒸、湿热等检疫处理中,厚垣孢子表现出一定的抗逆性,为研究该菌的灭活条件,需要人工培养大量的厚垣孢子。目前国外学者对于镰刀菌属厚垣孢子的培养条件研究较多。研究表明砂性土壤浸

渍液可以诱导厚垣孢子的形成^[16-17]。Sood^[18]用洋葱提取物诱导厚垣孢子的产生,8 d 后产孢量达到最大;温度 25~45℃ 有利于厚垣孢子的产生,其中 35℃ 最适;pH 值超出 6~7 这个范围厚垣孢子的形成将减少。Cochrane 等^[19]曾报道酸化的含有无机盐和葡萄糖的培养基可在短时间内诱导厚垣孢子的产生。Li 等^[20]研究得出 30℃ 有利于 *F. virguliforme* 的分生孢子在无菌水中形成大量的厚垣孢子。张定法等^[21]研究了培养液、pH 值、温度、光照、振荡条件对黄瓜枯萎病菌产生厚垣孢子的影响。但对于 *F. virguliforme* 厚垣孢子的产生条件和方法还缺乏系统深入的研究。该文主要研究培养液、pH 值、温度以及振荡条件等对北美大豆猝死综合症病菌产生厚垣孢子的影响,筛选出厚垣孢子产生的最适液体培养条件,从而为该病菌生物学特性和检疫处

收稿日期:2011-05-27

基金项目:国家质检总局科技计划资助项目(2009IK264)。

第一作者简介:师情(1986-),女,在读硕士,研究方向为微生物生态学。E-mail:shiqing1986511@163.com。

通讯作者:李会平(1974-),女,副教授,硕士生导师,研究方向为微生物生态学。E-mail:huipingli@sohu.com。

理措施等的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

北美大豆猝死综合症病菌菌株 (*F. virguliforme*) F-171, 来自美国阿肯色州, 由中国检验检疫科学研究院动植物检疫研究所提供。

1.2 试验方法

1.2.1 菌丝体的制备 将供试菌株培养于 PDA 平板上, 25℃ 黑暗培养 7 d, 在平板上用打孔器取直径 5 mm 的菌丝块接种于 PDB 培养基中, 250 mL 三角瓶 (100 mL 培养液) 接种 10 块, 在 25℃、130 r·min⁻¹ 振荡培养。7 d 后用 16 层无菌纱布过滤出菌丝体, 用无菌水冲洗 3 次后取菌丝体放于 100 mL 的烧杯内, 5 000 r·min⁻¹ 匀浆 2 min, 使菌丝体断裂, 制成菌丝体悬浮液。取 20 mL 悬浮液, 用双层滤纸过滤, 80℃ 烘干, 称量菌丝干重^[22]。

1.2.2 培养基对厚垣孢子产生的影响 用 250 mL 三角瓶, 装入 80 mL 各处理培养液 (各培养液配方见表 1, SN 培养液参照 Leslie^[23] 的方法), 取 25 mg 上述菌丝接种到培养液中, 30℃, 120 r·min⁻¹ 遮光振荡培养。培养 10 d 后, 超声波破碎 5 min, 使厚垣孢子脱离菌丝后, 用血球计数板镜检产孢量。每个处理 3 次重复。

1.2.3 pH 值对厚垣孢子产生的影响 采用大豆茎秆培养液, 1 mol·L⁻¹ 的 HCl 和 NaOH 调节培养液 pH 值, 设 pH 4、5、6、7、8 和 9 共 6 个处理, 其余方法同 1.2.2。

1.2.4 温度对厚垣孢子产生的影响 采用大豆茎秆培养液, 设 15、20、25、30、35 和 40℃ 共 6 个处理, 其余方法同 1.2.2。

1.2.5 振荡转速对厚垣孢子产生的影响 采用大豆茎秆培养液, 振荡转速设 0、80、100、120 和 140 r·min⁻¹ 共 5 个处理, 其余方法同 1.2.2。

1.2.6 装瓶量对厚垣孢子产生的影响 采用大豆茎秆培养液, 250 mL 三角瓶装瓶量设 60、80、100、120 和 140 mL 共 5 个处理, 其余方法同 1.2.2。

1.2.7 菌丝断裂程度对厚垣孢子产生的影响 采用大豆茎秆培养液, 菌丝体制备时匀浆转速设 0、2 500、5 000 和 7 500 r·min⁻¹ 共 4 个处理, 其余方法同 1.2.2。

1.2.8 产孢曲线 将以上研究得出的最佳单因素条件进行组合, 培养菌株 F-171 厚垣孢子, 4 d 后开始用血球计数板镜检产孢量, 绘制产孢曲线。其余方法同 1.2.2。

1.3 数据分析

采用 SPSS12.0 进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 培养基对厚垣孢子产生的影响

供试的 5 种培养基均能产生厚垣孢子 (表 1), 方差分析结果表明, 大豆茎秆培养基与豆芽汁培养基的产孢量显著高于其它 3 种培养液, 分别为 2.86×10^5 和 2.80×10^5 个·mL⁻¹; 其次是燕麦培养基, 为 2.60×10^5 个·mL⁻¹, 说明大豆秸秆与豆芽汁培养基为菌株 F-171 产生厚垣孢子的最佳培养基。

表 1 培养基对厚垣孢子产生的影响

Table 1 Effect of culture media on chlamydospore production

培养液 Culture medium	配方 Prescription	厚垣孢子数量 Chlamydospore number / × 10 ⁵ 个·mL ⁻¹
大豆茎秆培养液 Soybean stem liquid medium	大豆茎秆 40 g + 蒸馏水 1000 mL Soybean stem 40 g + distilled water 1000 mL	2.86 ± 0.04a
豆芽汁培养液 Soybean sprout juice medium	黄豆芽 100 g + 蒸馏水 1000 mL Soybean sprout 100 g + distilled water 1000 mL	2.80 ± 0.07a
燕麦片培养液 Oat liquid medium	燕麦片 40 g + 蒸馏水 1000 mL Oat 40 g + distilled water 1000 mL	2.60 ± 0.10b
SN 培养液 Spezieller Nährstoffarmer liquid medium	KNO ₃ 1 g + KCl 0.5 g + MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5 g + KH ₂ PO ₄ 1 g, 葡萄糖 0.2 g + 蔗糖 0.2 g + 蒸馏水 1000 mL KNO ₃ 1 g + KCl 0.5 g + MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5 g + KH ₂ PO ₄ 1 g + glucose 0.2 g + sucrose 0.5 g + distilled water 1000 mL	1.00 ± 0.02c
蒸馏水 Distilled water	1000 mL	0.52 ± 0.05d

平均值 ± 标准差; 用 LSD 法检验差异显著性, 同列数值后不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 下表同。

Mean ± Standard deviation (SD); Using LSD method to test significance of difference and the values within a column followed by different lowercase letters are significantly different ($P < 0.05$), the same as below.

2.2 pH 值对厚垣孢子产生的影响

在测定的 6 个 pH 范围内菌株 F-171 均能产生较多的厚垣孢子(图 1)。其中 pH 6 的产孢量显著高于其它 pH 值处理,达到 2.84×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 。说明 pH 6 的培养液最有利于菌株 F-171 产生厚垣孢子。

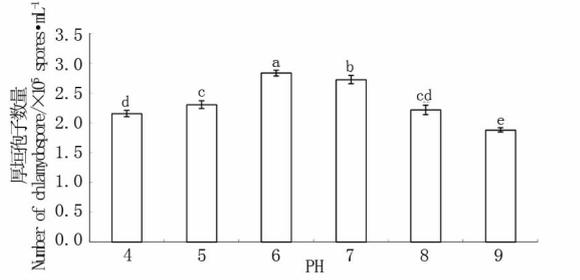


图 1 pH 值对厚垣孢子产生的影响

Fig.1 Effect of pH on chlamyospore production

不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 下同。

Different letters indicate significant difference ($P <$

0.05), the same as below.

2.3 温度对厚垣孢子产生的影响

菌株 F-171 在 $15 \sim 35^\circ\text{C}$ 温度范围内均能产生厚垣孢子(图 2), 方差分析结果表明, 25°C 和 30°C 产孢量显著高于其它温度, 分别为 2.88×10^5 和 2.82×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 。说明 $25 \sim 30^\circ\text{C}$ 温度范围是该菌株产生厚垣孢子的最适温度。

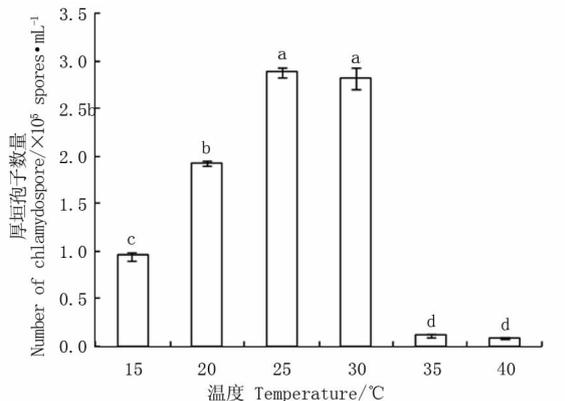


图 2 温度对厚垣孢子产生的影响

Fig.2 Effect of temperature on chlamyospore production

2.4 振荡转速对厚垣孢子产生的影响

振荡转速对厚垣孢子的产生有显著影响。从图 3 可以看出, 在 $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 转速条件下的产孢量最高, 为 2.78×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$; 静止培养的产孢量最低, 仅 3.0×10^3 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 。结果表明, $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 为最佳的振荡转速, 在低转速或静止条件下培养菌株 F-171 不利于厚垣孢子的产生, 同样, 转速太高也对厚垣孢子的产生不利影响。

2.5 装瓶量对厚垣孢子产生的影响

由图 4 可知, 5 个处理中, 250 mL 三角瓶装入 80

mL 培养液的产孢量最大, 达到 2.86×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$, 而装入 140 mL 的培养液产孢量最低, 仅为 8.1×10^4 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 。方差分析表明, 装瓶量为 80 mL 的产孢量显著高于其它处理, 装瓶量过多或过少均不利于菌株 F-171 产生厚垣孢子。

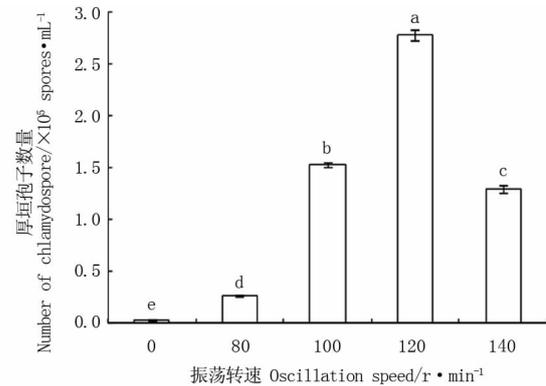


图 3 振荡转速对厚垣孢子产生的影响

Fig.3 Effect of oscillation speed on chlamyospore production

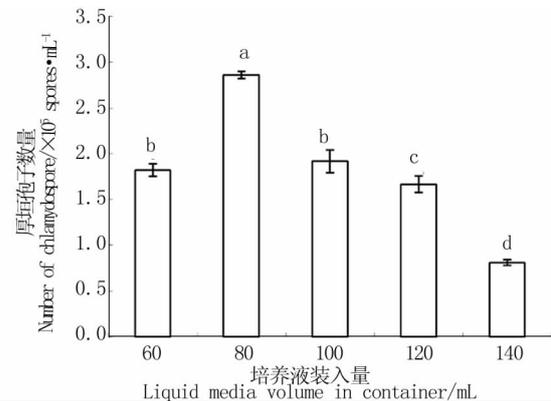


图 4 装瓶量对厚垣孢子产生的影响

Fig.4 Effect of liquid media volume in container on chlamyospore production

2.6 菌丝断裂程度对厚垣孢子产生的影响

从图 5 可知, 菌丝断裂程度对厚垣孢子产生的影响差异显著, 匀浆转速从低到高厚垣孢子的产量为依次为 1.62×10^5 、 2.04×10^5 、 2.76×10^5 、 3.02×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 。可见, 匀浆转速越高时, 菌丝断裂程度越高, 产孢量越多。

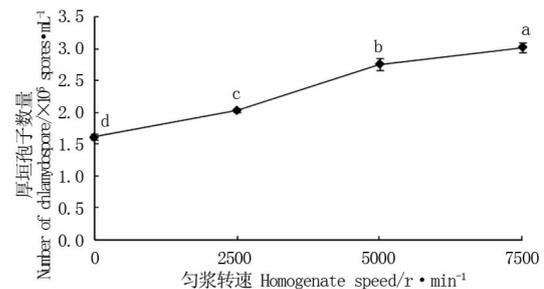


图 5 菌丝断裂程度对厚垣孢子产生的影响

Fig.5 Effect of homogenized hyphae on chlamyospore production

2.7 最佳培养条件下的产孢曲线

最佳单因素条件组合后的产孢曲线见图6,随着培养时间的延长,产孢量逐渐增加,第10天达到最大 3.15×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$;10 d以后产孢量无显著变化,曲线趋于稳定。组合后的产孢量显著高于单因素试验中的最大孢子量,为最适培养条件(图6)。

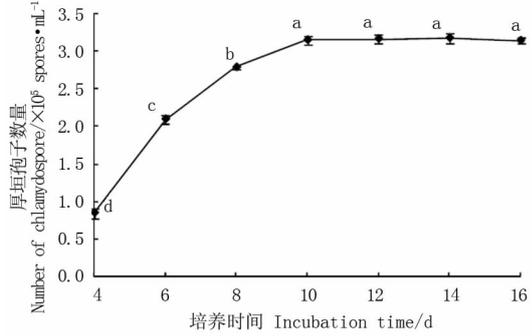


图6 菌株 F-171 厚垣孢子的产生曲线

Fig.6 The chlamydospore production curve of strain F-171

3 结论与讨论

真菌的生长发育需要一定的环境条件,有利于营养生长的条件,不一定有利于产孢^[24-25]。真菌厚垣孢子是菌丝细胞在不良环境条件下原生质收缩变圆而形成的厚壁孢子。该试验所选取的5种培养基中,产生厚垣孢子最多的是大豆茎秆培养基,其次是豆芽汁培养基,这与 Sood^[18]用寄主洋葱鳞茎汁液诱导厚垣孢子的方法相似,表明寄主植物汁液含有丰富的无机盐,可以促进厚垣孢子的产生。Hsu 和 Lockwood^[26]研究表明,当环境中能源不足,但有适当的无机盐时,有利于产生厚垣孢子。另外,菌丝体的断裂也刺激了厚垣孢子的产生,这可能是由于断裂菌丝不利于其营养生长,而有利于形成厚垣孢子。

各种环境因素在一定范围内均影响厚垣孢子的形成。该试验中北美大豆猝死综合症病菌 F-171 菌株产生厚垣孢子的最适温度范围为 25 ~ 30℃,这与 Li 等^[20]的研究结果相似,说明 *F. virguliforme* 在适宜的温度下可形成大量的厚垣孢子。菌株 F-171 产生厚垣孢子的最佳 pH 值为 6,这与 Sood^[18], Cochrane 等^[19]的结果相符,说明酸性环境有利于镰刀菌属厚垣孢子的形成。在供氧条件的试验中,适当的振荡转速有利于 *F. virguliforme* 产生大量的厚垣孢子,与张定法等^[21]的研究结果一致。这可能是由于当转速过低时,培养液中溶氧量少,菌丝在液面形成致密的菌丝层,不利于产生厚垣孢子;而转速太高,营养生长旺盛,厚垣孢子的产生期延后。

此外,装瓶量太多或者太少均不利于 *F. virguliforme* 产生厚垣孢子。其原因可能是当装瓶量太少时,瓶内虽有较大空间和通气量,但所含营养少;而装瓶量太多时,瓶内剩余空间小,不利于通气培养。

产孢曲线研究结果表明,随培养时间的延长,营养物质的耗尽,厚垣孢子数量逐渐增加,10 d 后达到峰值,说明厚垣孢子是镰刀菌渡过不良环境的一种生存形态。

参考文献

- [1] Aoki T, O'Donnell K, Homma Y, et al. Sudden death syndrome of soybean is caused by two morphologically and phylogenetically distinct species within the *Fusarium solani* species complex: *F. virguliforme* in North America and *F. tucumaniae* in South America[J]. Mycologia, 2003, 95(4): 660-684.
- [2] 秦国勋, 吴品珊, 张睿. 大豆猝死综合症研究进展[J]. 植物检验检疫科学, 2006, 16(1): 125-128. (Qin G X, Wu P S, Zhang R. Advances in research of sudden death syndrome of soybean[J]. Inspection and Quarantine Science, 2006, 16: 125-128.)
- [3] Roy K W. Sporulation of *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, causal agent of sudden-death syndrome, on soybeans in the midwestern and southern United States[J]. Plant Disease, 1997, 81(6): 566-569.
- [4] 杜琦, 李启新. 大豆猝死综合症[J]. 植物检疫, 1998, 12(5): 286-287. (Du Q, Li Q X. Sudden death syndrome of soybean[J]. Plant Quarantine, 1998, 12(5): 286-287.)
- [5] 吴品珊, 严进, Rupe J C, 等. 大豆猝死综合症病菌检测技术研究[J]. 植物病理学报, 2005, 35(6): 28-34. (Wu P S, Yan J, Rupe J C, et al. The detection techniques for sudden death syndrome[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2005, 35(6): 28-34.)
- [6] Hartman G L, Sinclair J B, Rupe J C. Compendium of soybean diseases[M]//St Paul, Minnesota: Published by the American Phytopathological Society, 1999: 37-39.
- [7] Anderson T R, Tenuta A. First report of *Fusarium solani* f. sp. *glycines* causing sudden death syndrome of soybean in Canada[J]. Plant Disease, 1998, 82(4): 448.
- [8] Scandiani M, Ruberti D, Pioli R, et al. First report of Koch's postulates completion of sudden death syndrome of soybean in Argentina[J]. Plant Disease, 2003, 87(4): 447.
- [9] 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. Concern new soybean disease[J]. Plant Quarantine, 2003, 17(4): 226-228.)
- [10] Aoki T, O'Donnell K, Scandiani M M. Sudden death syndrome of soybean in South America is caused by four species of *Fusarium*: *Fusarium brasiliense* sp. nov., *F. cuneirostrum* sp. nov., *F. tucumaniae*, and *F. virguliforme*[J]. Mycoscience, 2005, 46: 162-183.
- [11] Roy K W, Hershman D E, Rupe J C, et al. Sudden death syndrome of soybean[J]. Plant Disease, 1997, 81: 1100-1111.
- [12] 秦国勋, 吴品珊, 王源超, 等. 分子检测土壤中南美大豆猝死综合症病菌和北美大豆猝死综合症病菌[J]. 植物检疫, 2007, 21(6): 331-334. (Qin G X, Wu P S, Wang Y C, et al. Molecular detection of *Fusarium tucumaniae* and *Fusarium virguliforme* in soybean soil[J]. Plant Quarantine, 2007, 21(6): 331-334.)
- [13] 吴品珊. 大豆猝死综合症病菌检测技术研究及风险分析[D].

- 北京:中国农业科学院,2005:28-38. (Wu P S. The detection techniques and pest risk analysis for sudden death syndrome pathogens of soybean [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2005: 28-38.)
- [14] 黄跃才,章桂明,刘作易,等.大豆猝死综合症病菌枝状镰孢的活性检测研究[J].菌物学报,2009,28(2):236-243. (Huang Y C, Zhang G M, Liu Z Y, Chen Y H, Wang Y, Chen H J. Viability detection of *Fusarium virguliforme* [J]. Mycosystema, 2009, 28(2): 236-243.)
- [15] 崔友林.大豆茎枯病病原菌鉴定及3种检疫性大豆病原菌适应性分析[D].北京:中国农业科学院,2009:45-49. (Cui Y L. Identification of pathogen causing soybean stem blight and potential geographic distribution of three quarantine pathogens of soybean [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2009.)
- [16] Alexander J A, Bourret J H, Gold A H, et al. Induction of chlamydospore formation by *Fusarium solani* in sterile soil extracts [J]. Phytopathology, 1996, 56: 353-354.
- [17] Ford E J, Gold A H, Snyder W C. Soil substances inducing chlamydospore formation by *Fusarium* [J]. Phytopathology, 1970, 60: 124-128.
- [18] Sood S G. Production of chlamydospores by *Fusaria* in onion (*Allium cepa*) bulb extract [J]. Mycologia, 1996, 88(6): 1010-1013.
- [19] Cochrane V W, Cochrane J C. Chlamydospore induction in pure in *Fusarium solani* [J]. Mycologia, 1971, 63(3): 462-477.
- [20] Li S, Hartman G L, Gray E L. Chlamydospore formation, production, and nuclear status in *Fusarium solani* f. sp. *glycines* soybean sudden death syndrome-causing isolates [J]. Mycologia, 1998, 90(3): 414-421.
- [21] 张定法,刘鸣韬,朱盛安.黄瓜枯萎病菌产生厚垣孢子诱导条件的研究[J].河南科技学院学报,2010,38(1):30-32. (Zhang D F, Liu M T, Zhu S A. Study on inducing conditions of the chlamydospores from *Fusarium oxysporium* f. sp. *cucumarinum* [J]. Journal of Henan Institute of Science and Technology, 2010, 38(1): 30-32.)
- [22] 方中达. 植病研究方法 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 141-142. (Fang Z D. Plant pathology research method [M]. Beijing: China Agriculture press, 1996: 141-142.)
- [23] Leslie J F, Summerell B A. The *Fusarium* laboratory manual [M]. Iowa: Blackwell Publishing, 2006: 6.
- [24] 程明渊,刘洪涛,阎万元,等.人工条件下稻曲病菌厚垣孢子产生因素初探[J].吉林农业科学,1996(2):62-64. (Chen M Y, Liu H T, Yan W Y, et al. Preliminary studies on the factors influencing the sporulation of chlamydospores of *Ustilagoidea virens* (Cke.) Tak. *in vitro* [J]. Jilin Agricultural Sciences, 1996(2): 62-64.)
- [25] 秦芸,叶华智,黄芸.影响木霉菌厚垣孢子产生因素初探[J].云南农业大学学报,2002,17(4):416-417. (Qin Y, Ye H Z, Huang Y. Analysis for factor influencing development of *Trichoderma* chlamydospore [J]. Journal Yunnan Agricultural University, 2002, 17(4): 416-417.)
- [26] Hsu S C, Lockwood J L. Chlamydospore formation in *Fusarium* in sterile salt solutions [J]. Phytopathology, 1973, 63: 597-602.

2012 年《黑龙江农业科学》征订启事

《黑龙江农业科学》是黑龙江省农业科学院主办的综合性科技期刊,是全国优秀期刊、龙江省优秀期刊。现已被中国科学引文数据库、中国核心期刊(遴选)数据库等多家权威数据库收录。

本刊内容丰富,栏目新颖,信息全面,可读性强。月刊,每月10日出版,国内外公开发行。国内邮发代号14-61,每期定价5.00元,全年60.00元;国外发行代号M8321,每期定价8.00美元,全年96.00美元。

热忱欢迎广大农业科研工作者、农业院校师生、国营农场及农业技术推广人员、管理干部和广大农民群众踊跃订阅。全国各地邮局均可订阅,漏订者可汇款至本刊编辑部补订。汇款写明订购份数、收件人姓名、详细邮寄地址及邮编。

另外,2010年合订本已出版,还有少量2007~2009年合订本珍藏版。2007年合订本每册定价80.00元,2008~2009年合订本每册定价90.00元,2010年合订本150.00元,邮费各10.00元,售完为止。

欢迎投稿 欢迎订阅 欢迎刊登广告

地址:哈尔滨市南岗区学府路368号《黑龙江农业科学》编辑部 邮编:150086

电话:0451-86668373 信箱:nykx13579@sina.com 网址:www.haasep.cn