

植物病原菌监测方法和技术

周益林^{1*}, 黄幼玲², 段霞瑜¹

(1. 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100094;

2. 中国乡镇企业总公司, 北京 100026)

摘要 植物病原菌的监测对病害的预测和管理具有重要的意义, 本文系统介绍了植物病原菌监测方法和技术的发展, 以及现代分子生物学在病原菌监测中的应用研究。

关键词 植物病原菌; 监测方法和技术; 应用

中图分类号 S 431

Methods and techniques of monitoring of plant pathogens

Zhou Yilin¹, Huang Youling², Duan Xiayu¹

(1. *State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China;*

2. *China National Township Enterprise Corporation, Beijing 100026, China*)

Abstract Plant pathogen monitoring is very important for prediction and management of plant diseases. The development of methods and techniques of monitoring of plant pathogens, and application researches of technology of molecular biology in pathogen monitoring is reviewed in this paper.

Key words plant pathogen; method and technique; application

病原菌是植物病害三角或四面体中的要素之一, 其繁殖体或传播体的量或密度是病害发生和流行的一个重要驱动因子, 具有侵染能力的繁殖体或传播体的生存力、传播能力与病害的流行速度、流行期长短及分布范围有很重要的关系, 因此, 在一些病害的预测和管理中, 对其病原菌的繁殖体或传播体的监测也是必需的。病原菌种群数量的估测, 技术难度较大, 在绝大多数情况下, 由于个体微小或计数单元无法划分, 很难测定, 只有一些病原菌的繁殖体或传播体如菌核、孢子等可进行直接测定, 且只能测定传播体相对数量的变化或相对特定条件下群体的数量^[1-2]。这些原因制约了对病原菌的监测研究, 现代生物技术特别是分子生物学的飞速发展, 为此方面的研究提供了先进的技术支持, 近年来一些分子生物学方法和技术已逐渐应用到此领域中, 这必将推动病原菌监测技术的快速发展。

1 病原菌的监测技术和方法

用于植物病原菌繁殖体或传播体(孢子)数量或

密度监测的方法和仪器与非生物粒子或花粉的很相似。因为非生物粒子与病原菌孢子的大小比较接近, 非生物粒子的直径大小约为 1~40 μm , 真菌孢子为 10~40 μm , 气传细菌大一些约为几个毫米, 只不过对生物粒子的采样要求尽可能的不要损伤或不要破坏它们的生活力。尽管用于病原菌繁殖体或传播体的取样装置较多, 而且每种方法都有各自优缺点并只适于一定的粒子大小范围, 但其截获繁殖体或传播体的原理主要是基于重力沉降、惯性碰撞等。随着相关研究和技术的发展, 繁殖体或传播体取样装置不断得到改进和发展, 病原菌监测技术和方法准确度和专化程度在不断提高^[1]。

1.1 水平玻片法

采用水平放置涂有黏性物质(凡士林等)的玻片, 依靠重力沉降来收集病原菌孢子, 这是最早使用的孢子采样方法。此方法特点是经济且简便易行, 并可提供一定程度的定量或半定量的信息, 但它只适于较大孢子, 且易受旋风、涡流的影响, 而且捕捉效能不高。一般在中等风速下, 用此方法获得的估

收稿日期: 2006-09-04

修订日期: 2007-03-20

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2006BAD08A05, 2006BAD08A01); 粮食丰产科技工程项目(2006BAD02A16)

* 通讯作者 E-mail: ylzhou@ippcaas.cn

计值就明显低于实际值,高风速下,由于边缘效应或涡流,更使玻片表面很难截获病菌孢子。尽管水平玻片法不适于准确度要求高的大田和室外定量监测工作,但它还是比较适合雨水飞溅传播的病原菌或室内(温室和保护地等)病原菌的监测或取样。

玻片也可换成含有选择性培养基的培养皿,用来监测气传真菌孢子或细菌,提供繁殖体或传播体的生活力和种类信息。利用重力沉降方法取样的另一个变型是通过一个漏斗使病原菌随水流进一个收集器里如烧杯中,很显然此方法特别适于雨水传播的孢子。它可保持收集到孢子的湿度,不足之处就是在对收集的病原菌孢子计数前,需要对孢子进行有效的分离和浓缩。

1.2 垂直或倾斜玻片法或垂直圆柱体法

此方法所有的装置尽管与以上方法相同或非常相似,但垂直或倾斜玻片法或垂直圆柱体法主要是利用孢子在空气中的运动对收集器表面的碰撞而截获孢子的。由于它需要借助外界风的力量,所以此法的收集效能随风速而异。理论上讲,一般在静风中孢子不容易截获,而小孢子在中等风速以上,则容易被吹掉而丢失,并且此装置不适合收集风雨传播的孢子。因为孢子很容易从玻片或圆柱体上被冲刷下来,所以此方法被进一步发展,产生了旋转垂直胶棒孢子捕捉器—Rotorod[®][3]。此取样器是通过一对垂直的黏性棒高速旋转,与孢子发生碰撞来收集孢子。这种方法对直径大约 20 μm 的孢子的捕捉效率最高,而且能检测到低浓度的孢子,机械装置简单轻便,可用电池驱动,而且相对来说费用也不太高。其捕捉效率较高且受风速(低于 6.2 km/h 以下风速)影响不明显,实际的捕捉效率主要决定于孢子的密度和大小,原因是由捕捉表面的过饱和产生的,因此捕捉器的使用时间很重要。Rotorod 捕捉器由一对丙烯棒组成,它常常被做成 U 形,在电机的驱动下以一定的速度旋转,U 形棒宽 1.59 mm,且对直径 10~100 μm 的粒子捕捉效果最佳。Rotorod 有时也采用 H 形棒,一般棒宽 0.48 mm,它对粒子捕捉的最有效大小范围为 1~10 μm ,且棒宽越窄,对小粒子的捕捉效率越高。对 Rotorod 在相同取样速率下 U 形棒的捕捉效率可达到 70% 以上,H 形棒可达到 100%。捕捉效率是一个被称为 Stokes 数或粒子参数 p 的函数, p 可用以下的公式计算: $p = V_0 d^2 S_d / 18 n L S$ [式中 V_0 : Rotorod 臂的转速(cm/s); d :与所计算孢子等体积的球形直径; S_d :孢子的密度(g/cm^3); n :空气黏性($\text{g}/\text{s} \cdot \text{cm}$); L :捕捉棒的

宽度; S :孢子的动力形态因子,当椭圆的长轴与短轴比 <4 时, $S=1$]。很明显增加 V_0 和减少 L 都可提高捕捉效率。

1.3 吸入型孢子碰撞捕捉器

大多数此类捕捉器是用真空泵或其他空气驱动装置把孢子吸入捕捉器内,通过碰撞着落到一个运动的收集表面,它可计算出单位时间的孢子数量。由于此装置相对不受风速和孢子大小的影响,因此它可给出空气体积的读数(也被称为定容孢子捕捉器),这样就可测定出孢子在空气中的浓度即单位体积的孢子数目。这类捕捉器的误差主要来自两个方面,一是吸入误差,即孢子没有进入捕捉器的口;二是截获误差,则是孢子没有着落到正确的位置,或被捕捉器的内壁所截获,或者因为孢子从捕捉器中随空气穿过去。在这类捕捉器中是采用了孢子从环境中分离出来的最理想方法,即等空气速度取样。在取样过程中空气是通过与气流平行的尖边入口被吸入,此时在取样器中,如果空气被吸入的速度(V_s)等于环境中空气接近取样口的速度(V_A),所有在气流中的粒子都会进入取样口中。但是如果 $V_A > V_s$,部分空气改变方向,但这部分空气中粒子由于吸力进入取样器,这样就引起取样估计过高;当 $V_A < V_s$,在取样器进口附近的空气被吸入,但这部分空气中的粒子未进入而从进口外穿过,从而引起取样估计过低。现已有带风向标的取样器可根据环境中平均风速快速调节取样器的空气流速,达到等空气速度取样,但这种取样器一般不太适于田间的研究,因此目前的取样器大多还是设计为固定的空气流速,故此类取样器的收集效率与粒子的最大沉降速度、粒子惯性、取样器的头和进口的大小及吸入速度(V_s)和风速(V_A)有关。总的来说,收集效率随粒子的大小和风速的增加而增加,与取样器口的大小成反比[4]。

May 和 Sonkin 提出了一个串联式粒子碰撞捕捉器。它是由多个串联起来的管组成,每个管有一个小的空气喷口,在每个喷口正面放置涂有黏性物质的玻片,当空气被吸入通过每个喷口时,气流中的粒子就会着落到玻片上,通过调节喷口的大小和玻片与喷口的距离,可使每个玻片截获不同大小的粒子。基于这个收集器 Hirst 对其进行了改进[5],便产生了自动定容式孢子捕捉器,此装置工作过程是空气通过一个很窄的口被吸入,着落在可移动 2 mm/h 的玻片上,而且取样器带有风向标可保持取样口正对风向。Hirst 捕捉器的一个替代型号被称为 Burkard 7 天定容孢子捕捉器,它的主要改进在

于孢子被吸入后,可着落在一个表面覆有胶带的鼓上,而鼓与一个每7天旋转一圈的时钟连接,因此它可自动记录7 d的孢子数据,而不需要在此期间内更换截获孢子的鼓。Pay、Kramer和Pady及Kramer等在Hirst和Burkhard捕捉器的基础上又提出了Kramer-Collins孢子捕捉器,它结合了两者的特性。串联式孢子碰撞捕捉器还有另一类型Andersen捕捉器。这种捕捉器是让孢子着落培养基上,它不但适于空气中孢子量多时使用,而且还可使获得的孢子保持活性,另外还可通过使用选择性培养基,选择性地收集感兴趣的病原菌孢子。吸入型孢子碰撞捕捉器的收集效率可高达100%,但花费也较高。

1.4 移动式孢子捕捉器或取样器

移动式孢子捕捉器或取样器(RAM Air Sampler for Use with Moving Vehicle),其收集效率最高可达99%。它的设计吸收了以上的一些捕捉器或装置的特点,充分利用了空气动力学的原理。捕捉器工作过程是通过车辆的快速运动使进入的空气在一个带有喷嘴的锥形管道中加速,而排出空气的反向流动设计,使空气流动在喷嘴下的收集区中处于静止状态,从而使进入捕捉器的孢子依靠重力沉降,并均匀地落在收集器的底部。此捕捉器的最大特点是不破坏捕捉的孢子生活力,因此其主要适用于专性寄生菌如锈菌、白粉菌等病原菌孢子的取样,同时也可用于此类病原菌孢子的密度监测。

2 新技术在病原菌监测中的应用研究

由于传统孢子捕捉器的一些缺陷,如有时很难鉴定所捕获病原菌的种类,或对所捕获孢子的计数和定量工作繁琐费时等,而现代生物学方法如生化和分子生物学方法和技术可解决这些传统方法很难解决或棘手的问题。新技术与传统监测方法结合,可能对病原菌的监测更有效和更准确。目前这方面的研究已愈来愈受到人们的关注。如英国牛津大学Molly Dewey教授的研究小组,近年来通过研究已建立了快速定量检测灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)孢子的免疫荧光技术^[6];英国Rothamsted试验站通过把单克隆抗体技术与Rotorod捕捉器结合,设计出了旋转臂“免疫捕捉器(Immunotrap)”,已尝试用来定量监测油菜黑斑病菌(*Alternaria brassicae*)孢子(Fitt个人交流,2002)。同时Rothamsted试验站还采用了PCR技术开发出了油菜的2种主要病害*Leptosphaeria maculans*和*Pyrenopeziza brassicae*

特异性引物。这2种病害DNA已可从Burkard孢子捕捉器收集胶带上少量孢子中成功提取,并用PCR技术检测出,其中对这2种病菌,检测的最低孢子数分别可达到1和10个左右^[7]。Ma等通过研究开发出的基于Microsatellite引物的Nested-PCR检测技术,可有效检测核果褐腐菌(*Monilinia fructicola*)的孢子,对纯孢子样品最低可测到的DNA浓度相当于2个孢子,对来自Burkard孢子捕捉器的孢子样品最低可测到170个孢子^[8];Luo等在此研究的基础上开发出了*M. fructicola*的Real-time PCR检测技术,此方法通过建立Real-time PCR的Ct值与不同数量孢子DNA提取液浓度关系的标准曲线,测定来自Burkard孢子捕捉器的样品孢子的DNA浓度,可定量估计空气中此病原菌的孢子密度,它与传统显微镜孢子计数方法比较,不但省时省力,而且与传统方法的结果是一致的^[9]。

由以上病原物监测及其捕捉方法和技术的发展可看出,不同的孢子捕捉设备和方法及检测技术,其收集效率及所获得数据的精确度不同,而且成本差异也很大,所以应根据具体不同的研究内容和目标要求,采用不同的方法或技术,同时也欣喜地看到现代分子生物学技术在此领域的研究和应用,将大大提高病原菌的监测效率和准确性。

参考文献

- [1] CAMPBELL C L, MADDEN L V. Introduction to plant disease epidemiology [M]. New York: John Wiley & Sons, 1990: 75 - 104.
- [2] 曾士迈. 植保系统工程导论 [M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1994.
- [3] PERKINS W A. The rotorod sampler [C]// Second Semianual Report of the Aerosol Laboratory. Stanford University, Palo Alto, CA, 1957: 66.
- [4] RAYNOR G S. Sampling techniques in aerobiology [C]// EDMONDS R L. Aerobiology: The Ecological Systems Approach. PA: Stroudsburg, 1979: 151 - 172.
- [5] HIRST J M. An automatic volumetric spore trap [J]. Annals of Applied Biology, 1952, 39: 257 - 65.
- [6] DEWEY F M, EBELER S E, ADAMS D O, et al. Quantification of *Botrytis* in grape juice determined by a monoclonal antibody-based immunoassay [J]. American Journal of Viticulture and Enology, 2000, 51: 276 - 282.
- [7] CALDERON C, WARD E, FREEMAN J, et al. Detection of airborne inoculum of *Leptosphaeria maculans* and *Pyrenopeziza brassicae* in oilseed rape crops by polymerase chain reaction (PCR) assays [J]. Plant Pathology, 2002, 51: 303 - 310.
- [8] MA Z, LUO Y, MICHAILIDES T J. Nested PCR assays for detection of *Monilinia fructicola* in stone fruit orchards and

-
- Botryosphaeria dothidea* from Pistachios in California [J]. J Phytopathology, 2003, 151: 312 - 322.
- [9] LUO Y, MA Z, REYES H C, et al. Quantification of airborne spores of *Monilinia fructicola* in stone fruit orchards of California using real-time PCR [J]. European Journal of Plant Pathology, 2007, (in press).