

大豆疫霉慢生长菌株 HN-1 的生物学特性及传染规律

江涛¹, 潘月敏¹, 凌嵌崑², 曹舜¹, 陈艳芬¹, 高智谋^{1*}

(1. 安徽农业大学植物保护学院, 合肥 230036; 2. 南京农业大学生命科学学院, 南京 210095)

摘要: 观察和测定了大豆疫霉 (*Phytophthora sojae*) 慢生长菌株 HN-1 及其单游动孢子后代的培养性状及致病力, 并将其与正常生长的其他 3 个菌株进行对峙培养, 研究其慢生长特性传染规律, 测定受感染菌株的培养特性及致病力。结果表明, 大豆疫霉慢生长菌株 HN-1 的培养特性与正常菌株相比生长显著缓慢, 菌落形态有明显差异, 卵孢子产生量低, 对大豆幼苗的致病力显著较弱; 该菌的慢生长特性可通过无性繁殖传递至子代, 并可通过对峙培养传染至其他正常生长菌株, 传染后产生的受染菌株表现慢生长特性且致病力减弱。

关键词: 大豆疫霉; 慢生长菌株; 生物学特性; 传染规律; 生物防治

中图分类号: S435.651

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2012)06-0979-05

Biological characteristics and transmission rules of the slowly-growing *Phytophthora sojae* isolate HN-1

JIANG Tao¹, PAN Yue-min¹, LING Qin-yin², CAO Shun¹, CHEN Yan-feng¹, GAO Zhi-mou¹

(1. School of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. School of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract: The culture characters and pathogenicity of slowly-growing isolate HN-1 of *Phytophthora sojae* and its single-zoospore progeny were observed and measured, and the transmission rules and culture characters, pathogenicity of the infected cultures from HN-1 were researched through dual culture with other 3 normally-growing isolates. The results showed that the slowly-growing isolate HN-1 of *Phytophthora sojae* had significant difference on culture characters, growth rate and oospore production compared with normal-growing isolates. HN-1 was confirmed to be weak pathogenic isolate through inoculation *in vivo*. The characteristic of slowly-growing of HN-1 could be transferred to normal-growing isolates and the cultures through hyphal contact expressed slowly-growing characteristic and their pathogenicity were weakened.

Key words: *Phytophthora sojae*; slowly-growing isolate; biological characteristics; transmission rule; bio-control

大豆疫霉 (*Phytophthora sojae* Kaufmann et Gerdemann) 是大豆上寄生性很强、经济危害性大的重要病原卵菌之一。由该菌引起的大豆疫病于 1948 年在美国印第安那州首次记录, 是典型的土传病害, 一旦发生, 很难根治。Schmitthenner 曾报道, 实行非寄主轮作 4 年仍不能消除该病菌^[1]。该病害可在大豆的整个生育阶段发生和危害, 造成烂种、幼苗猝倒以及幼苗和成株的根腐、茎腐, 植株矮化, 甚至凋萎死亡。而截至目前, 大豆疫霉 (*Phytophthora*

sojae) 已广泛分布于美洲、亚洲、大洋洲、欧洲和非洲的近 20 个国家^[2-4]。在我国, 自 1991 年沈崇尧等^[5]首次在东北地区发现该菌引起的病害以来, 至今已经在黑龙江、山东、福建和安徽等多个大豆产区报道此病^[6-15], 说明该病害在我国已有较大规模的发生。由于其土传特性, 该病的防治成为一个世界性的难题, 依靠单一防治方法难以达到理想效果。低毒力菌株的发现及通过胞质传递低毒力因子控制毒力菌株造成的病害, 为寄主与病原之间平衡的研

收稿日期: 2012-06-06

基金项目: 国家公益性行业 (农业) 科研专项 (3-20) 资助。

作者简介: 江涛, 男, 硕士研究生。E-mail: chinagentony@126.com

* 通讯作者: 高智谋, 男, 博士, 教授, 博士生导师。E-mail: gaozhimou@126.com

究开辟了新途径。例如,法国曾通过人工接种弱毒菌株控制了栗疫病^[16]。通过弱毒性菌株进行生物防治是有利于农业可持续性发展的一种重要途径。目前,关于大豆疫霉菌慢生长菌株的研究尚未见报道。为此,作者在对大豆疫霉菌慢生长菌株 HN-1 进行培养观察的基础上,研究了其慢生长特性的传染性 & 传染规律,旨在为研究大豆疫霉菌的弱毒现象和弱毒机制,认识病原菌的致病机理,揭示病原菌致病力衰退的原因,为利用弱毒株来进行病害生物防治提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 供试菌株

供试大豆疫霉 (*Phytophthora sojae*) 菌株 AH、SD、HN-1 和 HN-2 分别从安徽、山东、河南发生大豆疫病的大豆田土壤中分离,经形态和致病性鉴定后获得,由安徽农业大学植物病原真菌研究室保存。其中菌株 HN-1 菌丝生长较其他菌株显著缓慢,为慢生长菌株。

1.2 培养基

利马豆培养基 (LBA), 0.2% V8 培养基,参照郑小波^[17]的方法配制。

1.3 菌株生物学特性测定

1.3.1 培养性状观察 用打孔器沿在 LBA 平板上培养 3 d 的供试菌株菌落边缘打取直径 6 mm 的菌丝块,移植到直径 9 cm 的供试 LBA 平板中央,每皿 1 块,25℃、黑暗条件下培养,1 周后,观察菌落形态。每处理重复 3 次。

1.3.2 卵孢子产生量测定 采用匀浆计数法^[17],计算单位体积培养基内所含卵孢子的数量。以接种点为中心,用手术刀切取 30 mm×30 mm 的菌丝块,置于匀浆机的匀浆杯中,加入 20 mL 自来水,5 000 r·min⁻¹ 匀浆 3 min,制成卵孢子悬浮液。匀浆结束后将匀浆杯中的卵孢子悬浮液倒入洁净培养皿盖中,另取 20 mL 蒸馏水冲洗匀浆机匀浆杯及刀片,将洗液一并倒入皿盖中,摇匀,使用微量加样器吸取 10 μL 轻轻涂抹于洗净的载玻片上,在排出悬浮液时将加样器吸头朝右侧略拖一下,将悬浮液在载玻片上拖成 1 条细短的带。在显微镜(4×10 倍)下观察,记下所观察卵孢子总数。每皿取 5 个 10 μL,计算平均值,3 次重复。

1.4 致病力测定

使用下胚轴伤口接种法,接种方法参照吴浩等^[18],略作修改。将在 LBA 上培养了 7 d 的大豆疫霉使用打孔器 (Φ 6 mm) 打取菌碟。鉴定用的植株

为生长 10 d (真叶展开时) 的合丰 35 大豆植株。用灭菌的 11 号手术刀在植株下胚轴 1 cm 处轻轻划伤,取菌碟接种到伤口处,使用脱脂棉保湿,保湿 24 h 后转到大棚内常规管理,每 24 h 保湿 1 次,连续保湿 3 d。同时接种无菌琼脂块为对照。

1.5 慢生长菌株 HN-1 垂直传染试验

菌株 HN-1 在 LBA 平板上生长 3 d 后,取菌丝块,按照高智谋等^[19]方法诱导孢子囊产生,制备游动孢子悬浮液。在冷却凝固的 0.2% V8 培养基平板上 (Φ 9 cm) 滴加游动孢子悬浮液 100 μL,均匀地涂布于培养基平板表面。培养皿置于 25℃、黑暗中培养 24 h,使游动孢子休止、萌发,并在培养基上形成微小菌落。进行单孢分离时,将培养皿盖打开,置于 100 倍显微镜下观察,用解剖刀将由单个游动孢子萌发形成的微小菌落连同周围的培养基切下,用灭菌解剖刀尖或尖嘴镊挑取置于 LBA 平板上,25℃培养 3 d,形成的菌落即为单游动孢子株。将上述 HN-1 各单游动孢子株移植于 LBA 平板上培养,方法参见 1.3.1,测定其生长速率等培养性状。连续测定 5 代。

1.6 慢生长菌株 HN-1 水平传染试验

将在 LBA 平板上培养 7 d 的各供试菌株沿菌落边缘分别用打孔器 (Φ 6 mm) 打取菌碟,将慢生长菌株 HN-1 分别与其他 3 个菌株进行对峙培养,即每皿各置 1 块 HN-1 菌碟与另一菌株菌碟,两者间隔 2 cm,25℃黑暗培养。当两菌落生长至边缘接触后,继续培养 48 h,然后在每皿中距离菌株 HN-1 最远端打取菌碟,每个组合各取 6 个菌碟,分别置于 LBA 平板上 25℃、黑暗培养,以慢生长型菌株 HN-1 和普通型菌株为对照,测定其慢生长性状,3 次重复;连续继代培养 5 代,测定其慢生长性状的稳定性。

1.7 受感染菌株 (培养物) 的致病力测定

分别以在垂直传染试验中获得的菌株 HN-1 的单游动孢子株 HN-1Z^S 和在水平传染试验中获得的感染慢生长的菌株 SD 的继代菌株 (记为 SD^S)、感染慢生长的菌株 HN-2 的继代菌株 (记为 HN-2^S) 为供试菌株,以慢生长型菌株 HN-1 和普通型菌株为对照,测定其对大豆幼苗的致病力,方法与 1.4 节相同。

2 结果与分析

2.1 慢生长菌株 HN-1 的生物学特性

2.1.1 培养性状 各供试菌株在 LBA 平板上的培养性状见表 1。通过观察可知,各供试菌株菌落均

呈圆形, 白色; 慢生长菌株 HN-1 较其他 3 个菌株生长速率明显缓慢, 7 d 后菌落直径仅为 46.13 mm, 而普通型菌株 AH、SD、HN-2 菌落直径分别达到了 65.38 mm、64.63 mm 和 64.25 mm; 各菌株菌落边缘亦有差异, 慢生长菌株 HN-1 菌落边缘菌丝呈放

射状, 较稀疏, 而菌株 AH、SD 及 HN-2 菌落边缘菌丝细致均匀; 慢生长菌株 HN-1 气生菌丝浓密发达且较粗长, 而 3 个普通型菌株气生菌丝均匀较稀疏, 较细短。

表 1 大豆疫霉慢生长菌株 HN-1 在 LBA 平板上的培养性状

Table 1 Cultural characters of slowly-growing isolates in *Phytophthora sojae* on LBA

菌株 Isolate	类型 Type	平均菌落直径/mm Average colony diameter	菌落形态 Colony morphology	
			边缘 Edge	气生菌丝 Aerial hyphae
AH	普通型 Ordinary	65.38 ^{Aa}	整齐 Neat	细短 Thin and short
SD	普通型 Ordinary	64.63 ^{Aa}	整齐 Neat	细短 Thin and short
HN-2	普通型 Ordinary	64.25 ^{Aa}	整齐 Neat	细短 Thin and short
HN-1	慢生长型 Slowly-growing	46.13 ^{Bb}	放射状 Radiate	浓密, 粗长 Thick and long

表 2 慢生长菌株 HN-1 与普通菌株在 LBA 平板上的卵孢子产生量的差异显著性

Table 2 Significance of difference on oospore production of slowly-growing and ordinary isolates cultured on LBA

菌株 Isolated strain	类型 Type	卵孢子产量/个·mL ⁻¹ Oospore production	差异显著性 Significance of difference	
			0.05	0.01
AH	普通型 Ordinary	5 840	a	A
SD	普通型 Ordinary	4 580	b	AB
HN-2	普通型 Ordinary	4 040	b	B
HN-1	慢生长型 Slowly-growing	2 160	c	C

表 3 大豆疫霉不同菌株所致病斑长度的差异显著性

Table 3 Significance of difference on lesion length caused by different isolates in *Phytophthora sojae*

菌株 Isolate	类型 Type	病斑长度/mm Lesion length	差异显著性 Significance of difference	
			0.05	0.01
AH	普通型 Ordinary	32.63	a	A
HN-2	普通型 Ordinary	31.60	b	A
SD	普通型 Ordinary	31.57	b	A
HN-1	慢生长型 Slowly-growing	24.67	c	B

2.1.2 卵孢子产生量 试验结果表明, 各供试菌株在 LBA 平板上均能产生卵孢子, 但产生量有极显著差异 (表 2), 菌株 AH 卵孢子产量为 5.84×10^3 个·mL⁻¹, 菌株 SD 为 4.58×10^3 个·mL⁻¹、菌株 HN-2 为 4.04×10^3 个·mL⁻¹, 慢生长菌株 HN-1 最少, 仅为 2.16×10^3 个·mL⁻¹。

2.2 慢生长菌株 HN-1 的致病力

试验结果表明, 各菌株接种后 2 d 所致的病斑长度存在显著差异 (表 3), 菌株 AH、SD、HN-1、HN-2 所致病斑平均长度分别为 32.63、31.57、24.67 和 31.60 mm, 菌株 AH 致病力最强, 而慢生长菌株 HN-1 致病力最弱。

2.3 慢生长菌株 HN-1 垂直传染试验

将慢生长菌株 HN-1 的单游动孢子后代 (第 1 代) 在 LBA 平板黑暗培养 7 d 后, 各单孢后代菌落

直径平均值为 45.75 mm, 气生菌丝浓密且较长而粗壮, 菌落边缘稀疏呈放射状, 与其亲代相似; 且其单游动孢子第 2 代和第 3 代单孢株的培养性状和慢生长特性与亲本一致。结果表明, 慢生长菌株 HN-1 的慢生长特性等培养性状能通过无性繁殖方式传递至子代。

2.4 慢生长菌株 HN-1 水平传染试验

试验结果表明, 经过对峙培养后, 正常生长的菌株对峙后的继代培养菌株生长速率明显受到慢生长菌株 HN-1 的影响, 但各菌株受影响程度表现不一。菌株 AH 受影响率最低, 对峙后所取的 6 个菌碟生长 7 d 后菌落直径较一致, 平均直径为 65.50 mm, 与亲本菌株 AH 无明显差异; 菌株 HN-2 对峙后所取的 6 个菌碟生长 7 d 后菌落直径出现差异, 菌落直径分别为 64.70、64.75、64.75、55.00、64.73

和 64.70 mm, 即有 1 个继代培养菌株生长速率明显低于亲本菌株 HN-2, 其受影响率为 16.67%; 菌株 SD 受影响率最高, 对峙后所取的 6 个菌碟生长 7 d 后菌落直径较正常生长的 SD 菌落均明显减小, 6 个培养物直径分别为 50.25、52.25、50.75、51.2、52.55 和 52.05 mm, 其受影响率达到了 100%; 且各菌落边缘开始出现稀疏放射状的菌丝, 气生菌丝均

明显增多。对传染试验获得的继代培养菌株在 LBA 平板上进行继代培养, 发现其生长速率与初始时相比无明显差异, 而且这些继代培养菌株的后代慢生长特性同样具有传染性。结果表明, 慢生长菌株 HN-1 的慢生长特性等培养性状能通过对峙培养方式传递给其他普通型菌株, 且普通型菌株一旦获得慢生长特性后即可通过继代培养方式传递至子代。

表 4 受染菌株(培养物)接种大豆幼苗所致病斑长度的差异显著性
Table 4 Significance of difference on lesion length caused by infected cultures through hyphal contact

菌株 Isolate	类型 Type	病斑长度/mm Lesion length	差异显著性 Significance of difference	
			0.05	0.01
AH	普通型 Ordinary	32.63	a	A
HN-2	普通型 Ordinary	31.60	b	A
SD	普通型 Ordinary	31.57	b	A
HN-2 ^S	受染菌株 Infected	25.67	c	B
HN-1	慢生长型 Slowly-growing	24.67	d	B
HN-1Z ^S	受染菌株 Infected strain	24.65	d	B
SD ^S	受染菌株 Infected strain	23.53	e	C

2.5 受染菌株(培养物)对大豆苗的致病力

试验结果表明, 各受染菌株(培养物)接种大豆幼苗后 2 d 所致的病斑长度与未受染的亲本相比显著减小(表 4)。受染菌株 HN-1Z^S 所致病斑长度为 24.67 mm, SD^S 为 23.53 mm, HN-2^S 为 25.67 mm, 均显著小于各自亲本。可见, 各受染菌株对大豆幼苗的致病力均较其亲本减弱; 慢生长菌株的慢生长特性与弱致病力是密切相关的; 慢生长菌株 HN-1 将慢生长特性传染给了正常生长的普通型菌株, 使其致病力减弱。

3 小结与讨论

本研究结果表明, 大豆疫霉菌株 HN-1 与其他 3 个供试菌株相比, 不仅其菌丝生长速率明显缓慢, 而且在相同营养条件下卵孢子产生能力也不及其他菌株, 同时, 菌落形态也出现异常分化, 这显示出该菌营养争夺和有性后代适应不良环境的能力较其他菌株差, 关于上述特性与该菌致病力的相关性正在研究中, 而试验中发现该菌株的慢生长特性可以通过垂直和水平传染方式影响其他菌株, 因此推断该菌株的菌丝体中可能存在一种可以传染导致菌株出现慢生长的因子, 并且可以传染给正常生长的大豆疫霉菌株, 但是来源不同的菌株受这种可传染因子的影响程度不一, 其原因有待进一步研究。

大豆疫霉引起的病害由于其土传特性而很难根治, 单一手段已经不能控制该病害。而随着社会经

济的发展以及人们环保意识的加深, 生物防治必将在该病害的防治中扮演越来越重要的角色。真菌弱毒菌株及其所含的可传染的弱毒因子的发现, 在真菌的生物防治研究中有着很重要的意义。它为人们在病原真菌种群中寻找有利因子控制病害提供了可能性。活体试验证明大豆疫霉菌株 HN-1 具有作为生防菌株的潜能。本研究结果对于该病菌的致病机制及所致病害的综合治理具有重要的参考价值。

关于大豆疫霉慢生长菌株 HN-1 中存在的可传染因子属于何种物质尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] Schmitthenner A F. Problems and progress in control of *Phytophthora* root rot of soybean [J]. *Plant Disease*, 1985, 69(4): 362-368.
- [2] Förster H, Tyler B M, Coffey M D. *Phytophthora sojae* races have arisen by clonal evolution and by rare outcrosses[J]. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1994, 7:780-791.
- [3] 王子迎, 王源超, 张正光, 等. 中国和美国大豆疫霉群体遗传结构的 ISSR 分析[J]. *生物多样性*, 2007, 15 (3): 215-223.
- [4] Wrather J A, Stienstra W C, Koenning S R. Soybean disease loss estimates for the United States from 1996 to 1998[J]. *Can J Plant Pathol*, 2001, 23(2): 122-131.
- [5] 沈崇尧, 苏彦纯. 中国大豆疫霉菌的发现及初步研究[J]. *植物病理学报*, 1991, 21(4): 298.
- [6] 徐永华. 大豆疫腐病早熟抗源[J]. *大豆通报*, 1999(3): 23-25.
- [7] 张国栋. 大豆疫霉根腐病[J]. *植物病理学报*, 1998, 28(3): 193-200.

- [8] 王华, 高峰, 吴彩兰, 等. 新疆大豆疫霉生物学特性及生理小种鉴定[J]. 新疆农业科学, 2008, 45(1): 126-129.
- [9] 王子迎. 安徽灵璧大豆根腐病病原物的分离与鉴定[J]. 安徽教育学院学报, 2007, 25(3): 96-98.
- [10] 朱振东, 王晓鸣, 王化波, 等. 蒙城大豆疫霉菌的鉴定及其生理小种[J]. 植物病理学报, 2001, 31(3): 296-301.
- [11] 文景芝, 张明厚. 黑龙江省大豆疫病病原鉴定[J]. 中国油料作物学报, 1998, 20(4): 76-78.
- [12] 陈庆河, 翁启勇, 王源超, 等. 福建省大豆疫病病原鉴定及其核糖体 DNA-ITS 序列分析[J]. 植物病理学报, 2004, 34 (2): 112-116.
- [13] 李长松, 赵玖华, 杨崇良, 等. 我国大豆根腐病研究概况及存在的问题[J]. 中国油料作物学报, 1997, 19(3): 82-84.
- [14] 武晓玲, 赵晋铭, 王永林, 等. 南京大豆根腐病病原物的分离及毒性鉴定[J]. 南京农业大学学报, 2009, 32(2): 61-64.
- [15] 吴向辉, 高智谋, 陆保君, 等. 疫霉菌对甲霜灵抗性的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2005, 33(2): 326-327.
- [16] Nuss D L. Biological control of chestnut blight: an example of virus-mediated attenuation of fungal pathogenesis[J]. Microbiological Reviews, 1992, 56: 561-576.
- [17] 郑小波. 疫霉菌及其研究技术[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1997.
- [18] 吴浩, 王良华, 吴新华, 等. 大豆疫霉在江苏省适应性的初步研究[J]. 南京农业大学学报, 2002, 25(1): 39-42.
- [19] 高智谋, 郑小波, 陆家云. 苎麻疫霉生物学性状的遗传与变异研究[J]. 菌物系统, 1999, 18(1): 35-43.

本刊外聘编委 岳永德教授

1978 - 1981 就读于浙江农业大学, 获农药残留与环境毒理方向硕士学位; 1985 年 11 月 - 1988 年 2 月在德国 Fraunhofer 环境化学和生态毒理学研究所及霍恩海姆大学植物医学系, 访问学者, 从事农药残留及环境毒理研究; 1993 年 3 - 10 月在德国萨尔兰大学生物化学和药物化学系, 高级访问学者, 从事农药代谢降解研究。1994-2003 年任安徽农业大学副校长, 2003 年 8 月调任国家林业局国际竹藤网络中心常务副主任。

兼任国家科技部“食品安全重大科技专项”专家组成员, 国家竹藤标准化委员会副主任委员, “茶叶生物技术”国家重点开放实验室学术委员会副主任, 享受国务院特殊专家津贴。

曾主持完成多项国家和省部级农药残留分析、典型环境污染物转归和农药安全使用标准研究课题。包括国家自然科学基金项目 3 项, 国家攀登计划子课题 1 项, 安徽省“九·五”、“十·五”攻关项目、安徽省自然科学基金等项目多项。近年主持了国家十五重大科技专项“农药残留检测技术”子项目 2 项, 国家 863 项目子项目 1 项。主编全国统编教材《农药残留分析》、《环境保护学》以及《茶叶农药残留与控制》、《有害生物综合治理与展望》、《农药残留研究进展》等著作。发表研究论文 100 余篇, 其中 SCI 收录 9 篇。曾获安徽省首届青年科技奖, 获省部级科技进步二等奖 2 项、自然科学三等奖 1 项和科技进步三等奖 2 项。