

影响大豆疫霉菌 (*Phytophthora sojae*) 卵孢子萌发的条件^{*}

左豫虎 臧忠婧 韩文革 刘惕若

(黑龙江八一农垦大学植物免疫研究室 密山市 158308)

摘要 培养 1 个月的大豆疫霉菌卵孢子在水琼脂或土壤薄膜上均可萌发,在水琼脂上萌发只形成芽管,在土壤薄膜上萌发形成芽管和孢子囊。卵孢子在两种基质上萌发最适温度为 18—24℃。光照刺激卵孢子萌发,抑制孢子囊的形成。卵孢子萌发不需外源养分。不同菌株卵孢子萌发率差异较大。

关键词 大豆疫霉菌;卵孢子;萌发条件

中图分类号 S 435.651 **文献标识码** A **文章编号** 1000—9841(2002)02—0101—05

大豆疫病 (*Phytophthora* Root Rot, 简称 PRR) 是典型的土传病害。1991 年沈崇尧首次报道在我国东北发现大豆疫霉^[1], 1996 年李宝英等^[2]报道在三江平原地区发现大豆疫霉, 近几年该病危害有逐年加重的趋势。其病原菌为大豆疫霉 (*Phytophthora sojae* Kaufmann & Gerdemann), 异名大雄疫霉大豆专化型 (*P. megasperma* Drechsler f. sp. *glycinea* Kau & Erwin) 或大雄疫霉大豆变种 (*P. megasperma* Drechsler var. *sojae* Hildebrand)。其有性生殖结构卵孢子为主要越冬菌源, 随土壤和病残体可远距离传播。遇适宜条件时萌发, 产生芽管直接发育成菌丝侵染寄主或于芽管顶端形成孢子囊并释放游动孢子侵染寄主。研究影响其萌发的主要条件是病原菌生物学特性研究的重要组成部分, 也是研究病害发生规律和防治的关键因素, 国内在这方面未见研究报导。本文就此方面进行了研究, 为研究此病害的发生规律和防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 营养物质对卵孢子形成及萌发的影响

供试培养基: 胡萝卜培养基(CA)、利马豆培养基(LBA)、V₈ 汁培养基(V₈A)、绿豆培养基(PA)、

水琼脂培养基(WA)。供试培养基制成平板, 移入直径为 8mm 的菌丝块, 25℃黑暗条件下保湿培养 30d。观察卵孢子量及卵孢子萌发率。每皿观察 10 个视野, 3 次重复。

供试菌株: Ps—111^[3], 由黑龙江八一农垦大学植物免疫研究室提供。

1.2 环境因子对卵孢子在水琼脂上萌发的影响

卵孢子悬浮液的制备: 参见 Sneh^[4]的方法, 略作改动。将 V₈A 上培养 30d 的 *P. sojae* 切成小块加入 150ml 无菌水, 倒入灭菌的组织捣碎机中, 高速转动 3min。转入灭菌三角瓶内, —7℃冰箱内保存 10h, 室温下解冻备用。

试验方法^[4]: 吸取浓度约为 10⁴/ml 的卵孢子悬浮液滴于 WA 平板上 20 滴, parafilm 密封培养皿, 于黑暗条件下培养, 定期观察卵孢子的萌发状况。每处理 3 次重复。

1.2.1 温度对卵孢子萌发的影响 将滴有卵孢子悬浮液的培养皿分别于 12℃、18℃、24℃、30℃黑暗条件下培养 12d 调查卵孢子萌发率。

1.2.2 卵孢子的萌发与菌龄的关系 用菌龄为 15d、30d、45d、60d 的菌块制备的卵孢子悬浮液, 滴于 WA 上 24℃黑暗条件下培养 12d, 调查卵孢子萌发率。

* 收稿日期: 2001—05—28

项目来源: 黑龙江省科委“九五”重大科技攻关项目(G97B2—3)

作者简介: 左豫虎(1965—), 男, 硕士, 副教授, 研究方向, 植物病理和植物免疫。

1.2.3 不同光照条件对卵孢子萌发的影响 设全光照、12h 光暗交替、全黑暗三个处理,将卵孢子悬浮液滴于 WA 平板上,置于 25℃黑暗条件下培养 12d 后调查卵孢子萌发率(光源采用 2 只 40W 荧光灯,距培养皿 60cm)。

1.2.4 不同菌株卵孢子萌发比较 供试菌株:Ps—111、Ps—212、Ps—322、Ps—411、Ps—511、Ps—R25、Ps—V1^[3]。培养 30d 的各菌株制备的卵孢子悬浮液,滴于 WA 平板上,24℃黑暗条件下培养 12d,调查卵孢子萌发率。

1.2.5 不同温度水浴处理对卵孢子萌发的影响 卵孢子悬浮液在 24℃、36℃水浴条件下分别处理 24h、48h、72h 后滴于 WA 平板上,24℃黑暗条件下培养 6、12、18d,调查卵孢子萌发率。

1.3 卵孢子在有土壤存在条件下的萌发

参照文献^[5]的方法,称取 0.2g 灭菌土,用紧实的棉球将其平展于直径为 7cm 的培养皿内,加无菌水至饱和,自然风干后形成土壤薄膜。每皿加入 2ml 卵孢子悬浮液,Parafilm 密封,25℃黑暗条件下培养 12d,检查卵孢子的萌发率。记载卵孢子萌发形成的孢子囊数和芽管数。每皿观察 150~200 个卵孢子,3 次重复。

1.3.1 卵孢子的萌发与温度的关系 将滴加孢悬液的培养皿分别置于 12℃、18℃、24℃、30℃恒温箱中黑暗条件下培养,12d 后观察卵孢子萌发率。

1.3.2 卵孢子萌发与光照的关系 设光照:黑暗为 6d;0d、4d;2d、2d;4d、0d;6d 4 个处理,25℃黑暗条件下培养 12d 后,观察卵孢子萌发状况。

1.3.3 卵孢子萌发与营养物质的关系 供试营养物质为去离子水(CK)、土壤提取液、灭菌的土壤提取液、稀释 10 倍的灭菌土壤提取液、0.5mg/ml 葡萄糖水溶液和 0.005mg/ml 葡萄糖水溶液。称取 0.3g 灭菌砂平铺于直径为 7cm 培养皿内,分别加入上述营养物质 1ml,再加入 2ml 卵孢子悬浮液,Parafilm 密封,25℃黑暗条件下培养 12d,调查卵孢子萌发率。

土壤提取液的制备:取大田土,碾碎,过筛(孔径 2mm)。风干后称取 1000g 加入 1000ml 蒸馏水中,充分振荡 12h,静置 12h 后取上层悬浮液 10,000 转/min 离心 10min。上清液高压灭菌 30min,既得灭菌土壤提取液。

1.3.4 不同菌株卵孢子萌发比较 供试菌株为 Ps—111、Ps—212、Ps—322、Ps—411、Ps—511、Ps—R25 和 Ps—V1^[3]。

将上述 7 个菌株的卵孢子悬浮液 2ml 加入风干

的土壤薄膜上,密封,25℃黑暗条件下培养 12d,调查卵孢子萌发率。

2 结果与分析

2.1 营养物质对卵孢子的形成及萌发的影响

不同培养基上卵孢子的产生量与萌发率均存在较大差异。CA 上卵孢子产生量最大,为 64.3 个/视野。PA 上仅为 4.5 个/视野。WA 上菌丝极为稀少,不产生卵孢子。培养 30d 后,卵孢子的萌发状况各异。在 LBA 上的萌发率为 42%,在 V₈A 上仅为 6%。在 CA、PA 上卵孢子不萌发(表 1)。

Schechter 等^[6]报导,做卵孢子萌发试验时应选用 LBA 上培养的卵孢子,其上培养的卵孢子萌发率达 80%以上,在 V₈A 上培养的卵孢子的萌发率相对较低。本试验结果表明,在 LBA 上培养的 *P. sojae* 卵孢子萌发率接近 50%(表 1)。镜检卵孢子萌发状况时难以将卵孢子制备液中已萌发的卵孢子与处理后萌发的卵孢子区分开,因而卵孢子萌发率的计数有误差。CA 上卵孢子产生量大,但是菌丝过于致密,低温处理后卵孢子悬浮液中仍混有大量菌丝,培养过程中菌丝扩展,不便观察。V₈A 上培养 30d 的卵孢子萌发率低,在 WA 上萌发率高达 68.8%(表 2),易于制备不含菌丝的卵孢子悬浮液。与 Schechter 报道的 V₈A 上培养的卵孢子在 WA 上萌发率为 16.6%有所不同。为便于比较卵孢子萌发试验,试验均采用 V₈A 培养的卵孢子制备的卵孢子悬浮液。

表 1 不同培养基上卵孢子的产生与萌发的差异

Table 1 The difference of oospore's production and germination on different culture

培养基 Media	卵孢子量 (个/100×视野) No. of oospores (100× eyeshot)	卵孢子萌发率(%) Germinate rate of oospore
CA	64.3	0.0
LBA	20.5	42.0
V ₈ A	15.4	6.0
PA	4.5	0.0
WA	0.0	0.0

2.2 环境因子对卵孢子在水琼脂上萌发的影响

2.2.1 温度对卵孢子萌发的影响 结果发现在 WA 上卵孢子萌发只形成芽管。卵孢子在 12~30℃均可萌发,在 24℃萌发率最高,为 68.8%(表 2)。

2.2.2 不同菌龄卵孢子萌发率比较 随着菌龄的增

大, 卵孢子萌发率增高(表 2)。菌龄 15d 的卵孢子培养 12d 其萌发率仅为 7.5%, 菌龄达到 30d 时, 萌发率增高到 68.8%。菌龄 45d 和 60d 的卵孢子萌发率几乎没有差异, 分别为 88.4%, 88.3%, 可见菌

龄大卵孢子成熟度高, 萌发速度快。当菌龄达到 45d 时, 可能卵孢子已完全成熟, 因此菌龄再增加萌发率没有显著变化。

表 2 环境条件对卵孢子在水琼脂上萌发的影响

Table 2 Effect of environment condition on oospore's germination on WA

温度(℃)	萌发率(%)	菌龄(d)	萌发率(%)	光照条件	萌发率(%)
Temp.	Germination rate	Age of mycelium	Germiation rate	Light condition	Germination rate
12	8.5	15	7.5	连续光照 Continue light	57.0
18	34.3	30	68.8	12h 光暗交替 12h light followed 12h darkness	54.4
24	68.8	45	88.4	连续黑暗 Continue darkness	42.3
30	44.2	60	88.3		

2.2.3 光照对卵孢子萌发的影响 卵孢子在光照条件下萌发率较高, 培养 12d 萌发率高达 57%, 且卵孢子产生孢囊梗数量较多。黑暗条件下卵孢子萌发率相对较低, 培养 12d 萌发率仅为 42.3%, 卵孢子产生孢囊梗的数量较光照, 光暗交替条件都相对较少(表 2)。

孢子囊与形成芽管的比例基本接近(表 5)。可见, 早春低温潮湿地块卵孢子萌发易形成孢子囊, 从而增加田间二次侵染来源, 有利于病害扩展。

表 4 不同温度水浴处理对卵孢子萌发的影响(萌发率%)
Table 4 Effect of treatment with water-bath under different temperatures on oospore germination (germination rate%)

处理 Treatment	培养时间(d) Cultivate time		
	6	12	18
24℃水浴 24h 24℃ water-bath for 24h	21.9	26.1	38.9
36℃水浴 24h 36℃ water-bath for 24h	32.4	75.7	80.9
24℃水浴 48h 24℃ water-bath for 48h	33.0	41.1	71.5
36℃水浴 48h 36℃ water-bath for 48h	50.8	79.0	89.4
24℃水浴 72h 24℃ water-bath for 72h	33.5	41.9	63.2
36℃水浴 72h 36℃ water-bath for 72h	44.9	72.4	78.6

2.2.4 不同菌株卵孢子萌发率比较 相同培养条件下不同菌株萌发率存在较大差异, 萌发率最大的 Ps-111 菌株, 第 12d 其萌发率为 68.8%, 萌发率最小的 Ps-511 菌株的萌发率仅为 25.8%, 两个菌株萌发率相差 43%(表 3)。其他菌株卵孢子萌发率也存在大小不同的差异, 这与菌株的致病力是否存在相关性有待进一步研究探讨。

表 3 不同菌株卵孢子萌发率比较

Table 3 Comparison of oospore's germination by different *P. sojae* isolation

培养时间(d)	卵孢子萌发率(%) Germiation rate of oospore							
Cultivating time	Ps-111Ps-322Ps-411Ps-212Ps-V1Ps-R2Ps-511							
6	61.8	43.0	14.9	28.9	20.8	19.5	14.4	
12	68.8	54.2	50.5	46.8	29.5	26.9	25.8	

2.2.5 不同温度水浴处理对卵孢子萌发的影响 36℃水浴处理后的卵孢子萌发率明显高于 24℃水浴处理。每一温度处理 24h 的萌发率均低于处理 48h, 72h。同是处理 24h, 36℃较 24℃处理的萌发率分别高 10.5%、49.6%、42.0%(表 4)。36℃水浴处理卵孢子萌发产生孢囊梗量相对较少。

2.3.2 卵孢子的萌发与光照的关系 光照明显抑制卵孢子产生孢子囊(表 5), 连续光照培养 12d 产生孢子囊的百分率仅为 2.3%, 连续黑暗条件下卵孢子产生孢子囊的百分率达 13.8%, 两者差异显著。光暗交替更有利于卵孢子萌发, 连续光照、连续黑暗条件下卵孢子总萌发率均低于光暗交替条件下的萌发率。光照时间长对孢子囊的产生有一定的抑制作用, 光照 8d 黑暗 4d 处理产生孢子囊仅有 9.3%, 明显低于连续黑暗和光照 4d 黑暗 8d 处理。

2.3 土壤存在条件下卵孢子的萌发

2.3.3 卵孢子的萌发与营养物质的关系 除未灭菌土壤提取液更有利于卵孢子萌发外, 其余处理萌发率均在 15.4%~23.0%之间, 差异不显著(表 5)。Jimenez^[5]报道, 营养物质浓度过高对卵孢子萌发有抑制作用。Schmitthenner^[7]报导, *P. sojae* 卵孢子萌发由自身某种内源机制所控制, 萌发时不需外界营养物质。本试验结果证明了后者的观点, 营养物质浓度的高低对卵孢子萌发未产生显著影响。但为

2.3.1 卵孢子的萌发与温度的关系 卵孢子在土壤薄膜上萌发可形成芽管或孢子囊, 不同温度条件下两种萌发方式所占比例不同。18℃萌发形成孢子囊的百分率为 22.1%, 形成芽管的百分率为 10.0%, 前者为后者的 2.21 倍。在 24℃下卵孢子萌发形成

什么未经灭菌的土壤提取液更有利卵孢子萌发, 土壤中提取液是否存与 *P. sojae* 起协同作用的微生物或某种其它刺激卵孢子萌发的物质, 有待进一步研究。

表 5 不同培养条件与卵孢子在土壤薄膜上萌发关系

Table 5 Relation between oospore germination on soil and different culture condition

培养条件		孢子囊形成(%)	芽管形成(%)	总萌发率(%)
Culture condition		Percentage of sporangia	Percentage of germ tube	Percentage of germination
温度(℃)	12	7.2	6.5	13.7
	18	22.1	10.0	35.1
	24	19.7	17.2	36.9
	30	4.0	8.7	12.7
光照条件	连续光照 12d Continued light	2.3 a	27.3 a	29.6 a
	连续黑暗 12d Continued darkness	13.8 bc	16.5 a	30.3 a
	光: 暗: 光: 暗= 4d 2d; 4d; 2d light; darkness; light; darkness	9.3 ab	28.8 a	38.1 a
	光: 暗: 光: 暗= 2d 4d; 2d; 4d light; darkness; light; darkness	17.2 b	19.0 a	36.2 a
营养物质	非灭菌土壤提取液 Soil extract	18.7	12.0	30.7
	灭菌土壤提取液 Sterilized soil extract	12.2	7.8	20.0
	稀释 10 倍的灭菌土壤提取液	6.8	8.3	17.1
	10 dilution of sterilized soil extract			
substance	0.005mg/ml 葡萄糖水溶液 Glucose	9.2	13.8	23.0
	0.5mg/ml 葡萄糖水溶液 Glucose	8.0	13.3	21.3
	无菌去离子水 SDW	5.8	9.6	15.4

注: 表中小写英文字母表示在 P=0.05 水平差异显著, 标有相同字母的值间无显著性差异。下同。Note: Small letters indicate significance at 0.05 level. Values followed by the same letter are not significantly different. The same in Table 6.

表 6 不同菌株卵孢子萌发情况

Table 6 Oospore's germination by different *P. sojae* isolates

菌株 Isolates	孢子囊形成(%) Percentage of sporangia	芽管形成(%) Percentage of germ tube	总萌发率(%) Percentage of germination
Ps-111	19.7	17.2	36.9 a
Ps-511	17.8	9.5	27.3 ab
Ps-V1	15.6	11.4	27.0 ab
Ps-212	8.4	10.3	18.7 bc
Ps-322	3.8	12.4	16.2 bc
Ps-R25	3.5	10.1	13.6 c
Ps-411	3.1	10.2	13.3 c

2.3.4 不同菌株卵孢子萌发比较 不同菌株相同处理条件下卵孢子总萌发率存在一定差异, 变值在 13.3%~36.9%之间。也有个别菌株之间存在显著差异, 如 Ps-111 和 Ps-411 两者差值达 23.6%。而且在土壤薄膜上各菌株卵孢子萌发率都不高, 均低于 40%。不同菌株在相同条件下萌发形成孢子囊和芽管的比例各不相同。Ps-111 菌株形成孢子囊百分率为 19.7%, 与形成芽管的百分率相接近, 而 Ps-322 菌株形成芽管的百分率为 12.4%, 比形成

孢子囊的百分率高 3.3 倍(表 6)。

3 结论与讨论

关于 *P. sojae* 卵孢子的萌发研究国内尚未见报道。鉴于 *P. sojae* 卵孢子萌发几乎不需外源营养, 因而采用营养含量较少的 WA 和土壤薄膜两种基质研究影响其萌发的主要因素。结果证明卵孢子在 WA 上萌发只形成芽管, 而在土壤薄膜上除形成芽管外, 还可形成孢子囊。这说明孢子囊的形成需要某些外源营养的刺激。营养物质浓度的高低对卵孢子萌发未产生显著影响。但未灭菌的土壤提取液能明显促进卵孢子萌发, 其原因有待进一步研究。

卵孢子在 WA 上萌发适温为 18~24℃。光照促进其萌发。36℃恒温水浴给卵孢子一个预热过程, 卵孢子的萌发率明显提高。卵孢子在土壤薄膜上萌发适温为 18~24℃。温度偏低时卵孢子萌发形成孢子囊的比例远高于芽管。这或许是春季低温多雨发病重的原因之一。

光照对总萌发率影响不大, 但抑制孢子囊的形

成。本试验结果证实了 Jimenez B 等^[5] 关于光照抑制卵孢子萌发形成孢子囊的观点。Sneh B 等^[4] 认为全黑暗条件有利于卵孢子萌发。本试验证明无论在 WA 还是在土壤薄膜上, 卵孢子在全黑暗条件下萌发率均不高, 而且在 WA 上全黑暗条件下的卵孢子萌发率远低于光照和光暗交替条件下的萌发率, 此结论与 Sneh B 等的观点不尽相同。

在 WA 和土壤薄膜上不同菌株卵孢子萌发率存在差异, 且不同菌株在相同条件下萌发形成孢子囊和芽管的 比例不同, 这或许是菌株间致病力存在差异的原因之一, 有待进一步研究证实。

参 考 文 献

1 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.
2 李宝英, 马淑梅. 大豆疫霉菌研究初报[J]. 大豆科学, 1996, 15 (2): 164—165.
3 臧忠婧, 左豫虎, 刘惕若, 等. 大豆疫霉菌的分离、鉴定及菌株致病力的测定[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2000, 12(1): 37—42.
4 Sneh B, Eye L L, Lockwood J L. Factors affecting germination of oospores of *Phytophthora megasperma* var. *sojae* [J]. Phytopathol. Z. 1981, 101: 314—322.
5 Jimenez B, Lockwood J L. Germination of oospores of *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* in the presence of soil [J]. Phytopathology. 1982, 72: 662—666.
6 Schechter S E, Gray L E. Oospore gemination in *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* [J]. Can. J. Bot. 1987, 65: 1465—1467.
7 Schmitthenner A F. Problems and progress in control of phytophthora root rot of soybean[J]. Plant Disease, 1985, 69(4): 362—368.

STUDIES ON GERMINATING CONDITION OF OOSPORES OF *Phytophthora sojae*

Zuo Yuhu Zang Zhongjing Han Wenge Liu Tiruo

(*Research Laboratory of Plant Immunology, Heilongjiang August First Land Reclamation University, Mishan 158308*)

Abstract Oospore of *Phytophthora sojae* can germinate on water agar(WA) or on thin coat of soil by culturing one month. On WA it only produced germ tubes. On the coat of soil it germinated germ tubes and sporangias. The optimum temperature for oospore germination was 18—24℃. Light stimulated germination of oospores but restrained them to produce sporagium. Germination of oospores don’ t need exotexix nutrient. Oospore germination differed significantly among different isolates.

Key words *Phytophthora sojae* ; Oospore; Germinating condition