

黑龙江省不同地区大豆菌核病病原菌分离物的形态学分析

战宇航, 宋巍巍, 范冬梅, 金 勋, 张锦义, 韩英鹏, 李文滨

(东北农业大学 大豆研究所, 大豆生物学省部共建教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘 要:利用 PDA 培养法从黑龙江省黑河、绥化和佳木斯等 3 个地区大豆发病田中, 共分离和纯化出 135 个菌核病病原菌分离物, 并对菌落的形状、生长速率、菌核重量和子囊盘等形态学特性进行了分析。结果表明: 在菌落的形状和生长速率方面, 不同地区的分离物群体间差异极显著, 同一地区内各个分离物的表现一致性较好; 在菌核重量和子囊盘形态特性方面, 不同病原菌分离物产生的菌核的数量、大小、重量及子囊盘形态明显不同。不同采样地点的大豆菌核病病原菌菌落的形状和生长速率存在区域专化性, 即 3 个采样地点的菌落形状和生长速率存在明显差异, 而菌核重量和子囊盘形态特性不存在区域专化性。

关键词:大豆; 菌核病; 形态特征

中图分类号: S432.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2010)01-0072-05

Morphological Trait Analysis of Soybean *Sclerotinia sclerotiorum* Isolates Derived from Different Location of Heilongjiang Province

ZHAN Yu-hang, SONG Wei-wei, FAN Dong-mei, JIN Xun, ZHANG Jin-yi, HAN Ying-peng, LI Wen-bin

(Soybean Research Institute, Key Laboratory of Soybean Biology in Chinese Ministry of Education, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

Abstract: Soybean white mold is one of the popular diseases threatening soybean production, and causes serious yield decline. Morphological trait of soybean *Sclerotinia sclerotiorum* isolates wasn't clear for soybean studiers. For deepening the understanding of pathogen isolates, we separated a total of 135 isolates of *Sclerotinia* pathogens from three regions, including Heihe, Jiamusi and Suihua of Heilongjiang Province through PDA method. The objectives of the present study were to analyze the morphological trait of soybean *Sclerotinia pathology*. In this study, many morphology traits, such as colony shape, growth rate, sclerotia weight, ascus morphology, were measured. The results showed that the shape of the colony area and growth rate was significantly different among three sampling locations, and similar within each sampling locations. Other morphological trait of different isolates including the number, size, weight, of sclerotia, and morphological trait of apothecium, was significantly different whether among or within sampling locations. Results suggested that shape of the colony area and growth rate of isolates was specific to sampling location, while other morphological traits of different isolates including the number, size, weight, of sclerotia, and morphological trait of apothecium, wasn't specific to sampling location.

Key words: Soybean; *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary; Morphological trait

大豆菌核病又称白腐病, 是世界性范围的真菌病害。在我国各大豆产区均有发生, 尤其以黑龙江省、内蒙古自治区危害较重。20 世纪 80 年代以来, 黑龙江省菌核病日趋严重, 发病率由 1983 年 5% 左右上升到 1987 年的 20% ~ 30%, 严重地块高达 50% 以上。近年来, 黑龙江省由于大豆栽培面积增加, 重茬现象严重, 加剧了大豆菌核病病害的发生,

甚至造成部分地区大豆绝产^[1]。目前, 防治大豆菌核病的最有效方法是培育抗病品种。Boland 等^[2]研究不同大豆材料对菌核病菌的抗性差异, 为开展大豆抗源筛选及抗菌核病育种工作提供了依据。但目前由于缺乏对大豆主要产区菌核病病原菌的形态学特性的认识, 已严重阻碍了大豆抗性育种的进程。

目前, 国内外大豆菌核病研究主要集中在病害

收稿日期: 2009-07-10

基金项目: “十一五” 国家高技术研究发展计划目标导向资助项目(2006AA10ZF1Z1); 科技部国际合作资助项目; 东北农业大学大学生科技创新基金资助项目(20080108)。

第一作者简介: 战宇航(1987-), 女, 在读本科, 研究方向为植物病理学。E-mail: zyh1987420@163.com。

通讯作者: 李文滨, 教授, 博士生导师。E-mail: wenbinli@yahoo.com。

的发生流行^[3]、发病程度和范围^[4]、产量损失^[1]、寄主范围^[5]、综合防治措施^[1,3-6]等方面;但对病原菌形态学特性却缺乏系统的认识。

该文对采自不同地区的菌核病菌进行形态学特性比较与分析,为大豆抗菌核病育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试病原菌的采集、分离、纯化及扩繁

从黑龙江省黑河、绥化和佳木斯等 3 个地区大豆田中发病株上采集菌核,每个病株采 1 个菌核,所采菌核置于培养皿中,用封口膜密封带回,并进行室内分离。用镊子夹取菌核,用 75% 乙醇浸泡 20 s,进行表面消毒后将菌核置于灭过菌的滤纸上,吸干表面液体。将菌核移至 PDA 培养基上,在 20℃ 黑暗条件下培养 4~5 d 后选取 1 个菌落进行菌丝鉴定。挑取带有菌丝的菌块 0.5 cm²,移至新的 PDA 培养基上,如此数次进行纯化^[7]。

在菌丝体培养过程中,随时观察菌核的发育情况,如果存在其他真菌或细菌的污染,采用孙君明^[8]的方法立即将其转移到新的 PDA 培养基上进行继代培养,直到完全纯化为止。

琼脂(20 g·L⁻¹)和土豆提取液(土豆 200 g 切块,加入 1 000 mL 蒸馏水煮沸 30 min,过滤)蔗糖(20 g·L⁻¹)添加到 1 个大的锥形瓶中,封口,高温灭菌(121℃,20 min)。无菌操作下,将 15 mL 培养基倒入已灭菌的培养皿中,冷却后用镊子将活化的病原菌接种于培养皿中央,置于 22℃ 温箱中培养接种备用。

1.2 菌核病的形态学和菌落生长速率检测

135 个不同区域和寄主来源的病原菌分离物用于菌落生长速率、颜色、形状和其它形态学特性

分析。

在直径 90 mm 的玻璃平板培养基(含有经高温灭菌的 15 mL 的 PDA 培养基)上进行菌核病菌落的生长速率检测。为了精确测量菌落直径大小,必须将菌核准确放置在平板培养基的中心位置,然后用 Parafilm 膜密封培养皿盖口,在室温条件下培养。每个待测病原菌分离物 3 次重复。每天观察菌核病菌落的生长情况,在第 2 天开始测量菌落直径,每天测量 1 次。采用数据处理软件 DPS3.0 分析每个病原菌分离物的菌落平均生长速率。每个病原菌分离物生长 1 个月以后,观察并记录菌落的颜色、形状、菌丝体的丰度等指标。收集每个培养皿中的菌核,记录菌核数量、大小和形状,同时称量每个培养皿中菌核的总鲜重,然后将菌核在室温放置 40 d,称量菌核总干重,计算菌核的干/鲜重比。PDA 培养基上培养病原菌分离物时,在散射光的条件下子囊盘柄膨大形成子囊盘,2 个月后观察子囊盘的形态特性^[8]。

2 结果与分析

2.1 菌核病菌落的形态分析

采自绥化的分离物 Sh11、Sh16 和 Sh18 具有显著不同的菌落特征(图 1),分离物 Sh16 和 Sh18 具有典型的菌核病形态特征,表现为中等丰度的菌丝体、大小中等的圆形或半圆形的菌核、以及菌核通常形成 1~2 个环中心区带,突出于培养基表面,成熟时容易与培养基分离等特性;而分离物 Sh11 则表现为菌核大小不一、形状无规则以及菌核无规则地散布在培养基内且较难与培养基分离;而采自黑河的分离物 Hh25 和采自佳木斯分离物 Jms30 在整个测试过程中未生成任何菌核,仅产生丰富的白色菌丝体。

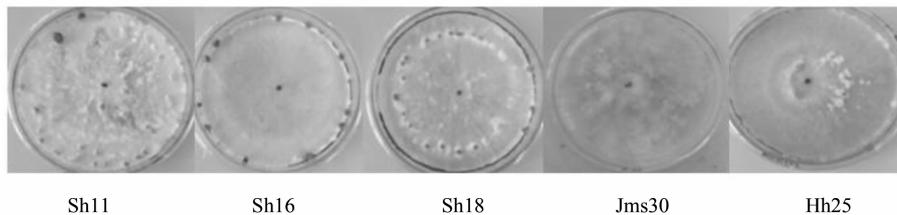


图 1 采自不同采集地点的分离物在 PDA 培养基上的菌落特征

Fig. 1 Colony characteristics of isolates collected from different sampling regions

大部分病原菌分离物在 PDA 培养基上培养几天后,均可产生菌核,并根据病原菌分离物、营养条件和生长环境的不同形成 1 个或多个环中心的

菌核区带。第 1 个菌核区带通常形成于接近培养基的边缘。菌核呈圆形、纺锤形、扁圆形、球形以及许多不规则形状,且不同地区的病原菌分离物

间的菌核大小、数量、形状和重量也是不同的。来自绥化地区的病原菌分离物 Sh11 的菌核明显不同于其它群体,主要表现为大小不一的、不规则形状,菌核的表面洼陷,而来自其它群体的分离物的菌核呈现典型的菌核特征,表现为中等大小、有规则形状(圆形或椭圆形等),容易与培养基分离(图1)。

2.2 菌核的大小和重量差异

表1显示了不同病原菌分离物在PDA平板($d = 90$ mm)培养基上培养1个月后形成的菌核大小、数量、重量(鲜重和干重)的变化。不同病原菌分离物(即使来自同一地区)产生的菌核数量、大小和重量明显不同。就菌核总重量而言,来自黑河的分离物 Hh8 产生的菌核重量最高(鲜重:1.5350 g,干重:0.6613 g);除来自佳木斯的分离物 Jms30 没有产生菌核外,分离物 Jms55 产生的菌核最少(鲜重:0.2402 g;干重:0.0534),分离物 Hh8 的菌核干重是 Jms55 的12倍;就菌核的数量和单个重量而言,病原菌分离物 Hh9 的菌核数量最多(128个),来自佳木斯的病原菌分离物 Jms33 的菌核数量最少(16个),其单个菌核的重量最重($10.03 \text{ mg} \cdot \text{个}^{-1}$ 菌核),分离物 Jms36 单个菌核重量最轻($2.34 \text{ mg} \cdot \text{个}^{-1}$ 菌核,图2)。

另外,不同地区的菌核病菌核(个体)的干鲜重比也不相同,来自佳木斯的病原菌分离物 Jms55 的干鲜重比最低(0.22);Jms41 最高(0.59)(表1)。

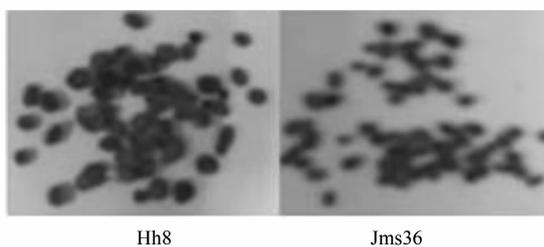


图2 采自不同采集地点的菌核的重量
Fig.2 Weight of sclerotia from different sampling locations

2.3 菌落的生长速率

在PDA培养基上,采用继代培养的方法研究135个不同来源的病原菌分离物的生长速率。结果显示,虽然病原菌分离物来自不同的地区和寄主,但大部分分离物在PDA平板培养基上($d = 90$ mm)的生长速率都非常快。不同地区的病原菌分离物群体间的平均生长速率差异显著。黑河地区病原菌分

表1 不同地区来源的菌核病菌核的大小、重量和数量

Table 1 Size, weight and number of sclerotia from different sampling regions

地区 Sampling region	菌核编号 Isolate number	菌核重量 Weight of sclerotia/g		干/鲜 重比 Dry/wet	菌核 数量 Number of sclerotia	单个菌核 重量 Weight of single sclerotia /mg
		鲜重 Wet weight	干重 Dry weight			
黑河	Hh1	1.0283	0.4286	0.42	65	6.59
Heihe	Hh5	0.8145	0.3796	0.47	72	5.27
	Hh6	0.9759	0.4470	0.46	65	6.88
	Hh7	0.5614	0.2711	0.48	39	6.95
	Hh8	1.5350	0.6613	0.43	80	8.26
	Hh9	1.3996	0.6694	0.48	128	5.23
	Hh11	0.4726	0.2154	0.46	57	3.78
	Hh12	0.6589	0.3073	0.47	46	6.68
	Hh18	0.6756	0.2763	0.35	86	3.21
	Hh35	0.5990	0.2894	0.48	68	4.26
	Hh36	0.7998	0.3866	0.48	78	4.96
	Hh37	0.5890	0.2730	0.46	78	3.50
	Hh38	0.6753	0.3174	0.47	51	6.22
	Hh39	0.7642	0.3476	0.45	105	3.30
	Hh40	0.8193	0.3677	0.45	93	3.95
	Hh42	0.7171	0.3170	0.44	106	2.99
	佳木斯	Jms1	0.5874	0.2565	0.44	44
Jiamusi	Jms2	0.5523	0.3242	0.44	104	3.12
	Jms3	0.4487	0.2218	0.48	49	4.53
	Jms4	0.5515	0.2103	0.37	54	3.89
	Jms14	0.3494	0.0949	0.24	30	3.16
	Jms15	0.3253	0.1247	0.36	17	7.49
	Jms17	0.6547	0.3579	0.55	48	7.46
	Jms27	0.8969	0.4131	0.46	72	5.74
	Jms28	0.2336	0.1190	0.50	21	5.67
	Jms29	0.6018	0.2420	0.40	42	5.76
	Jms33	0.2806	0.1604	0.57	16	10.03
	Jms34	0.3836	0.2230	0.58	36	6.19
	Jms36	0.3275	0.0960	0.29	41	2.34
	Jms41	0.7311	0.4283	0.59	76	5.64
	Jms55	0.2402	0.0534	0.22	18	2.97
	Jms57	0.6243	0.2090	0.33	29	7.21
	Jms58	0.8726	0.3167	0.36	86	3.68

离物群体的平均生长速率($v = 31.0167 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$)极显著高于其它地区,培养4d后大部分病原菌分离物的菌丝体均生长到培养皿的边缘;而来自佳木斯地区的病原菌分离物群体的平均生长速率最低($v = 23.4430 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$),与绥化地区病原菌分离物群体的平均生长速率($v = 24.1333 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$)差异显著,与黑河地区病原菌分离物群体的平均生长速率

差异极显著(图3)。

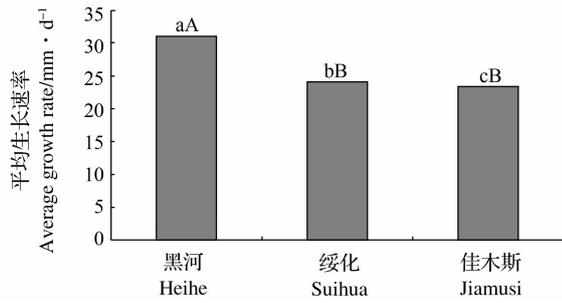


图3 不同地区病原菌分离物群体的生长速率差异

Fig. 3 Growth rate difference of isolates in different regions

病原菌分离物群体生长速率的变异系数以佳木斯群体最高,绥化群体最低(表2)。表明对于病原

菌分离物群体生长速率参数,佳木斯群体内的一致性相对较差,而绥化群体内的分离物一致性较好。不同病原菌分离物的群体间生长速率存在极显著差异($F > F_{0.01}$)。

2.4 子囊盘的形态分析

在 PDA 培养基上培养病原菌分离物时,在有散射光的条件下子囊盘柄膨大形成子囊盘,且形态差异明显。子囊盘表面光滑,大部分子囊盘是由 1 个子囊柄和 1 个子囊头组成,形似茶杯或茶碟。如 Hh51 子囊头表面凹陷呈杯状结构,微深褐色,子囊柄的颜色也较深;Hh52 的子囊柄的颜色明显较浅,呈棍棒状,表面平滑;而 Hh81 的形态比较特殊,在 1 个子囊头处生长出 2 个子囊柄,子囊头为深褐色,子囊柄呈棕色(图4)。

表2 不同地区病原菌分离物的生长速率方差分析表

Table 2 Variance analysis of growth rate of sclerotinia isolates from different sampling regions

取样点 Sampling region	均值 Mean	变异系数 Coefficient of variant/%	变异来源 Variant source	平方和 Sum of squares	自由度 Freedom	均方 Mean square	F	$F_{0.01}$
佳木斯 Jiamusi	23.4430	7.3	处理间	105.2179	2	52.6089	772.1352	10.9248
黑河 Heihe	31.0167	6.2	处理内	0.4088	6	0.0681		
绥化 Suihua	24.1333	4.9	总变异	105.6267	8			



图4 采集自相同地点的分离物的子囊盘的形态

Fig. 4 Morphological trait of apothecium derived from different sampling regions

3 讨论

对大豆菌核病进行大规模研究的一个重要前提就是病原菌的分离问题。宋超等^[9]对新疆核盘菌的培养性状及其致病性进行了研究。该研究对黑龙江省黑河、绥化和佳木斯 3 个地区的 135 个病原菌分离物进行了分离纯化,所有经消毒的菌核病菌核在 PDA 培养基上接种 3 d 后都开始发育,形成菌丝体。表明初始菌丝主要来自菌核的内部,而不是菌核表面的菌丝片段,与孙君明^[8]得出的结论基本一致。由于分离材料选择的是病株菌核,加上分离技术处理得当,因此可以最大限度的避免次生腐生菌、

细菌和霉菌的污染,获得较为纯化的病原菌分离物。

研究发现来自不同地区的 3 个群体之间的病原菌分离物在菌落的形状和生长速率方面差异极显著,绥化群体内的各个分离物的表现一致性较好。

研究过程中,通过 PDA 培养基培养的子囊盘虽形态差异明显,但子囊柄均为棍棒状,并未出现盘状。原因可能是菌核的采集地范围相对较小。在同一培养条件下出现的特殊形态特征是否属于新类型,有待于在分子水平做进一步研究。

Calla 等^[10-11]报道了采用高通量测序法分析菌核与大豆的小 RNA 组分及变化,从转录组水平上研究了大豆菌核的致病过程,不仅从基因水平上可以

指导大豆抗菌核病育种,而且也为菌核病的进一步研究提供了大量的测序数据,这些转录组数据与该研究表型数据的结合及进一步分析,可进一步推动大豆抗菌核病分子标记辅助育种。

参考文献

- [1] 赵丹,许艳丽,李春杰.大豆菌核病的识别与综合防治[J].大豆通报,2006(3):15-16. (Zhao D, Xu Y L, Li C J. Identification and integrated managements for soybean *Sclerotinia Sclerotiorum* [J]. Soybean Bulletin, 2006(3):15-16.)
- [2] Boland G J, Hall R. Evaluating soybean cultivars for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* under field conditions[J]. Plant Diseases, 1987, 71(10):934-936.
- [3] 韩立新,刘颖,吴晓艳,等.大豆菌核病流行原因分析及综合治理措施[J].上海农业科技,2006(6):35-41. (Han L X, Liu Y, Wu X Y, et al. Analysis of prevalence of soybean *Sclerotinia* and comprehensive control measures[J]. Shanghai Agricultural Science and Technology, 2006(6):35-41.)
- [4] 董全中.大豆菌核病的发生规律及综合防治[J].大豆通报,2003(3):56-63. (Dong Q Z. Occurrence of soybean *Sclerotinia* and integrated control[J]. Soybean Bulletin, 2003(3):56-63.)
- [5] 谢丽华,刘辉,王险峰,等.克H3防治大豆菌核病田间效果研究[J].现代化农业,2007(10):37-41. (Xie L H, Liu H, Wang X F, et al. Ke-H3 of soybean *Sclerotinia* control the effectiveness of field research[J]. Modernization of Agriculture, 2007(10):37-41.)
- [6] 许艳丽,战丽莉,李春杰,等.大豆病害发生特点和综合防治技术[J].大豆科技,2009(3):35-29. (Xu Y L, Zhan L L, Li C J, et al. Soybean diseases of the characteristics and integrated control techniques[J]. Soybean Bulletin, 2009(3):35-29.)
- [7] 方中达.植病研究法[M].北京:农业出版社,1982. (Fang Z D. Plant disease research[M]. Beijing: Agricultural Press, 1982.)
- [8] 孙君明.不同菌核病(*Sclerotinia sclerotiorum*)分离物的形态学、致病性和遗传多样性研究[D].北京:中国农业大学,2005. (Sun J M. Determination of Morphology, Pathogenicity and genetic diversity of *Sclerotinia Sclerotiorum* (Lib.) De Bary isolates from different origins [D]. Beijing: China Agricultural University, 2005.)
- [9] 宋超,唐庆华,李国英,等.新疆核盘菌的培养性状及其致病性研究[J].石河子大学学报(自然科学版).2007,25(3):170-171. (Song C, Tang Q H, Li G Y, et al. Studies on the cultural characteristics and the Pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary in Xinjiang[J]. Journal of Shihezi University (Natural Science), 2007, 25(3):170-171.)
- [10] Calla B, Varala K K, Win H, et al. Preliminary analysis of high-throughput expression data and small RNA in soybean stem tissue infected with *Sclerotinia sclerotiorum*[C]. Proceedings of the International Sclerotinia Workshop. May 31- June 4, 2009, Wilmington, NC. P. 6.
- [11] Calla B, Simmonds D, Clough S J, et al. Genomic analysis of soybean defense response to *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. Phytopathology, 2008, 98(6):30.
- [12] 惠建民,黄继明,白文军.不同茬口对大豆产量的影响[J].现代化农业,1997(5):10. (Hui J M, Qiu Y N, Xiao G C, et al. Effect of different crop stubbles on soybean yield[J]. Modern Agriculture, 1997(5):10.)
- [13] 田秀萍,邱永宁,肖桂才,等.茬口对农作物产量影响的研究[J].黑龙江八一农垦大学学报,2000,12(1):19-23. (Tian X P, Qiu Y N, Xiao G C, et al. Study on effect crop stubble for crop yield[J]. Journal of Heilongjiang August First Land Reclamation University, 2002, 12(1):19-23.)
- [14] 薛庆喜,宦立海,张玉春,等.不同作物茬口对重茬和连作大豆产量及农艺性状的影响[J].黑龙江农业科学,2006(6):20-22. (Xue Q X, Huan L H, Zhang Y C, et al. Effects of different crop stubbles on grain yield and agronomic characters of soybean continuous cropping [J]. Heilongjiang Agricultural Science, 2006(6):20-22.)
- [15] 薛庆喜.不同作物茬口对连作大豆产量及农艺性状的影响[J].大豆科学,2009,28(1):72-75. (Xue Q X. Effects of different crop stubbles on yield and agronomic characters of continuous cropping soybean[J]. Soybean Science, 2009, 28(1):72-75.)

(上接第71页)