

大豆灰斑病菌 (*Cercospora soja*) 生物学特性的研究

钟兆西 王 伟 张桂荣

(东北农学院)

摘 要

大豆灰斑病菌 (*Cercospora soja*) 在大豆叶葡萄糖琼脂培养基上的生长速率较在 PDA 上快86%，在小白菜琼脂和番茄琼脂培养基上的产孢量分别约为 PDA 的 8 倍和 6 倍。此菌的生长发育温度最适为 25—28℃，低于15℃或高于35℃均不适宜。黑暗条件较为有利。在 pH 4—9 之间，均能生长和产孢，但以 pH 5 生长最适，pH 6—7 产孢量最多。分生孢子在蒸馏水里亦萌发得很好，半小时就能萌发，经 3—4 小时后萌发率显著上升，5 小时萌发率达90%以上。在10—40℃之间均能萌发，最适温度为 28—30℃。以 pH 7 萌发最好。黑暗条件有利萌发，阳光直射对孢子萌发有明显的抑制作用。

大豆灰斑病在黑龙江省东部地区发生严重，近年来有向别的大豆产区蔓延的趋势，已引起人们的关注^[1]。过去，对该病的化学防治、病原菌生理小种的鉴定、以及抗病育种等曾有过一些报导^[2、3、4]，但对该病菌的生物学特性，未见详细报导。为了明确该病菌的生长、产孢、以及孢子萌发所要求的条件，作为病害流行测报的基础，我们对其生物学特性进行了较为系统的研究。

材 料 与 方 法

供试菌种：在大豆感病品种“绥农4号”的种子中，挑选典型症状的灰斑粒，按常规方法在 PDA 培养基上分离，获得病菌的纯培养，为使供试菌种保持遗传的一致性，再进行单孢分离。将单孢分离的斜面培养，用适量无菌水配成孢子悬浮液，散布在培养皿的 PDA 上，培养 10—12 天，供试验用。

本文于1988年10月12日收到。

This paper was received on Oct. 12, 1988.

大豆灰斑病菌生长及产孢的研究: 用直径为 3mm 的无菌打孔器, 在供试菌种的 PDA 平板上, 取定量菌块, 接种到平皿培养基上, 置各种试验的条件下培养, 每隔 1 天测量菌落直径。经 10 天后, 每皿用 10ml 蒸馏水冲洗, 用血球计数板法测定其产孢量。每处理重复 3 次。

大豆灰斑病菌分生孢子萌发条件的研究: 每皿供试菌种用 15—20 ml 无菌水冲洗, 并配成每毫升约含 40,000 个孢子的孢子悬液。在每块凹玻片上滴 2—3 滴孢子液, 然后将凹玻片放入培养皿中, 置各种试验条件下, 经 0.5、1、2、3、4、5、6 小时取出, 用棉兰固定, 镜检每百个孢子的萌发数, 取 6 次读数的平均值以作比较。每处理重复 3 次。

试 验 结 果

一、大豆灰斑病菌生长及产孢的研究

1. 不同培养基对病菌生长及产孢的影响: 供试培养基有: (1) PDA、(2) 大豆叶 PDA、(3) 大豆叶马铃薯琼脂、(4) 大豆叶葡萄糖琼脂、(5) 大豆叶琼脂、(6) 芹菜琼脂、(7) 菠菜琼脂、(8) 番茄琼脂、(9) 胡萝卜琼脂、(10) 小白

表 1 不同培养基对大豆灰斑病菌生长及产孢的影响

Table 1 Effects of different media on growth and sporulation of *C. sojina*

培 养 基 Media	菌 落 直 径 (cm) Diameter of the colonies					培养 10 天后产孢量 ($\times 10^4$) Conidia No. after 10 day
	2 天 (D.)	4 天 (D.)	6 天 (D.)	8 天 (D.)	10 天 (D.)	
马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA)	0.39	0.90	1.29	1.48	1.77	13.5
大豆叶马铃薯葡萄糖琼脂 (Soybean-leaf-PDA)	0.42	1.05	1.27	1.60	1.92	42.5
大豆叶马铃薯琼脂 (Soybean leaf potato agar)	0.42	0.88	1.07	1.21	1.39	13.0
大豆叶葡萄糖琼脂 (Soybean leaf glucose agar)	0.57	1.42	1.98	2.36	3.04	13.5
大豆叶琼脂 (Soybean leaf agar)	0.47	0.86	1.02	1.17	1.21	8.1
芹菜琼脂 (Celery agar)	0.50	0.86	1.16	1.38	1.65	30.2
菠菜琼脂 (Spinach agar)	0.42	0.73	1.01	1.22	1.43	4.9
番茄琼脂 (Tomato agar)	0.40	0.90	1.24	1.47	1.70	83.3
胡萝卜琼脂 (Carrot agar)	0.38	0.74	1.11	1.38	1.63	29.9
小白菜琼脂 (Chinese cabbage agar)	0.58	0.91	1.27	1.46	1.75	105.1
黄瓜琼脂 (Cucumber agar)	0.35	0.67	0.92	1.07	1.57	51.4
红萝卜琼脂 (Red turnip agar)	0.40	0.74	1.08	1.27	1.43	45.6
青萝卜琼脂 (Green turnip agar)	0.41	0.75	1.09	1.28	1.49	51.4

菜琼脂、(11) 黄瓜琼脂、(12) 红萝卜琼脂、(13) 青萝卜琼脂等培养基。接种定量菌块后, 置25—28℃下培养。结果如表 1。

结果表明, 小白菜琼脂培养基产孢量最多, 而菌落扩展速度与产孢量无相关性, 病菌在大豆叶葡萄糖琼脂培养基上生长速度最快, 但产孢量少。

2. 温度对病菌生长及产孢的影响: 取定量菌块接种到 PDA 培养基平板上, 分别置不同温度梯度下培养。结果表明, 病菌在低于 15℃或高于 35℃时, 经 10 天后菌落仍不扩展, 也未产孢。菌丝生长和产孢的最适温度为25—28℃。(见表 2)

3. 光照对病菌生长及产孢的影响: 取定量菌块接种到小白菜琼脂培养基上, 分别

表 2 温度对病菌生长及产孢的影响
Table 2 Effects of temperature on growth and sporulation of *C. sojae*

温 度 (℃) Temperature	菌 落 直 径 (cm) Diameter of the colonies					培养10天后产孢量 (—×10 ⁴) Conidia No. after 10 days
	2 天(D.)	4 天(D.)	6 天(D.)	8 天(D.)	10 天(D.)	
10	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0
15	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0
20	0.33	0.59	0.71	0.90	0.93	4.7
23	0.41	0.61	0.90	1.26	1.29	8.3
25	0.43	0.74	1.24	1.67	2.04	17.0
28	0.45	0.98	1.33	1.56	1.93	17.2
30	0.39	0.52	0.66	0.80	0.85	0.8
33	0.35	0.42	0.47	0.61	0.71	0.5
35	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0
37	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0
40	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0

表 3 光照对病菌生长及产孢的影响
Table 3 Effects of light on growth and sporulation of *C. sojae*

光 照 Light	菌 落 直 径 (cm) Diameter of the colonies					培养10天后产孢量 (—×10 ⁴) Conidia No. after 10 days
	2 天(D.)	4 天(D.)	6 天(D.)	8 天(D.)	10 天(D.)	
连续光照 (Continuous light)	0.33	0.45	0.72	0.83	0.64	0.7
光照黑暗交替 (Alternative light and darkness)	0.43	0.58	0.87	1.13	1.74	34.3
连续黑暗 (Continuous darkness)	0.53	0.92	1.74	1.68	2.67	92.5

置连续光照 (20w 荧光灯, 距离 50cm)、12 小时光照 12 小时黑暗交替和连续黑暗下, 培养温度为 28℃。结果如表 3。

结果表明, 灰斑病菌在连续黑暗的条件下, 菌落扩展最快, 产孢量最多。

4. pH 值对病菌生长及产孢的影响: 用 40% NaOH 和 6N HCl 调节小白菜琼脂培养基的不同 pH 值, 然后接种定量菌块, 置连续黑暗条件下培养。结果如表 4。

表 4 pH 值对病菌生长及产孢的影响
Table 4 Effects of pH on growth and sporulation of *C. sojae*

pH 值	菌 落 直 径 (cm)					培养 10 天后产孢量 ($\times 10^4$)
	Diameter of the colonies					Conidia No. after 10 days
	2 天(D.)	4 天(D.)	6 天(D.)	8 天(D.)	10 天(D.)	
3	0.31	0.34	0.37	0.41	0.42	0
4	0.34	0.43	0.69	0.95	1.24	0.3
5	0.56	1.15	1.70	2.18	2.77	44.3
6	0.53	1.12	1.58	1.97	2.50	68.7
7	0.59	1.77	1.67	2.06	2.47	89.7
8	0.52	1.25	1.65	2.06	2.36	54.7
9	0.47	1.07	1.43	1.74	2.16	28.6

结果表明, 灰斑病菌在 pH 3—9 下均能生长, 而以 pH 5 最为适宜。病菌的产孢量则以 pH 7 最多。

二、大豆灰斑病菌分生孢子萌发条件的研究

1. 分生孢子萌发与营养的关系: 供试营养为 10% 豆叶汁液, 4% 葡萄糖液、4% 蛋白胨液, 以蒸馏水作对照。在每块凹玻片上滴供试营养液 2 滴和孢子液 2 滴, 置 28℃ 下培养。结果如表 5。

表 5 不同营养液对病菌孢子萌发的影响
Table 5 Effects of different culture fluid on conidia germination of *C. sojae*

营 养 液	孢 子 萌 发 率 (%)						
	Germination rate of conidia						
	0.5 小时 (hrs.)	1 小时 (hrs.)	2 小时 (hrs.)	3 小时 (hrs.)	4 小时 (hrs.)	5 小时 (hrs.)	6 小时 (hrs.)
10% 豆叶汁液 Soybean leaf extract	4.00	6.28	8.11	23.86	51.64	89.49	94.78
4% 葡萄糖 Dextrose	4.58	8.86	9.54	23.61	66.19	82.75	98.93
4% 蛋白胨 Peptone	5.02	9.22	9.89	10.68	11.55	46.67	55.42
蒸 馏 水 Distilled water	2.25	6.74	8.79	29.84	83.16	94.33	99.29

从试验结果可以看出,病菌孢子萌发对营养要求不严,在蒸馏水中亦萌发得很好。

2. 温度对病菌孢子萌发的影响:病菌孢子在10—40℃之间均能萌发,最适温度为25—33℃。0.5小时就能萌发,低于15℃或高于37℃,萌发率显著降低。(见表6)

表6 温度对病菌孢子萌发的影响

Table 6 Effects of temperature on conidia germination of *C. sojae*

温 度 (℃) Temperature	孢 子 萌 发 率 (%) Germination rate of conidia						
	0.5小时 (hrs.)	1 小时 (hrs.)	2 小时 (hrs.)	3 小时 (hrs.)	4 小时 (hrs.)	5 小时 (hrs.)	6 小时 (hrs.)
10	0.67	4.00	4.29	4.43	4.65	4.80	6.16
15	2.32	5.17	7.03	8.01	7.62	9.77	9.81
20	4.44	6.41	9.44	14.10	40.83	89.65	94.19
25	5.04	6.64	9.09	14.99	40.28	91.67	98.66
28	8.19	8.41	10.56	23.22	57.65	84.90	97.70
30	8.38	8.40	15.99	24.50	65.37	96.47	100.00
33	7.25	7.27	10.85	18.20	65.86	96.51	100.00
35	1.25	1.84	3.84	8.38	17.04	88.67	95.02
37	1.22	1.04	2.32	4.64	6.70	24.63	35.71
40	1.16	1.96	2.56	2.87	4.73	9.92	20.90

3. 光照对病菌孢子萌发的影响:病菌孢子在黑暗和室内散射光的条件下,萌发都很好,而在直接阳光照射下,萌发率很低,阳光对孢子萌发有明显的抑制作用。(见图1)

4. pH 值对病菌孢子萌发的影响:用 M/5 Na₂HPO₄ · 2H₂O 和 M/10 柠檬酸配成

表7 pH 值对病菌孢子萌发的影响

Table 7 Effects of pH on conidia germination of *C. sojae*

pH 值	孢 子 萌 发 率 (%) Germination rate of conidia						
	0.5小时 (hrs.)	1 小时 (hrs.)	2 小时 (hrs.)	3 小时 (hrs.)	4 小时 (hrs.)	5 小时 (hrs.)	6 小时 (hrs.)
3	1.04	1.25	2.72	3.54	3.98	4.20	11.79
4	1.36	1.38	2.60	4.27	6.72	9.33	13.89
5	2.70	8.84	11.79	13.91	14.80	15.01	18.22
6	2.80	2.51	4.24	6.38	12.20	39.22	57.44
7	2.65	2.69	4.18	6.10	12.49	39.19	62.20
8	1.95	1.96	3.46	7.09	17.86	31.14	56.91

不同 pH 值的缓冲溶液冲洗供试菌种，配成新鲜孢子悬液作萌发试验。结果表明病菌孢子在 pH 3—8 下均能萌发，其中以 pH 6—8 萌发较好。（见表 7）

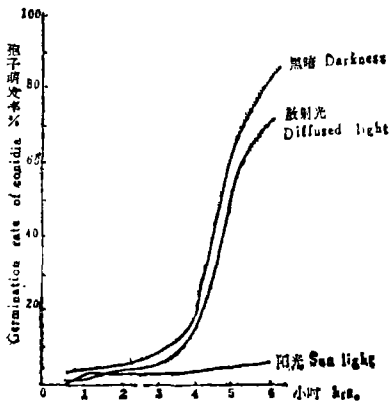


图1 光照对病菌孢子萌发的影响
Fig. 1 Effects of light on conidia germination of *C. sojina*

结 论 与 讨 论

大豆灰斑病菌在一般培养基下，生长和产孢均不够理想，国外多用 V-8 培养〔5、6〕，我国并无 V-8 制品，需要另找别的培养基。经研究证明，在供试的 13 种培养基中，大豆灰斑病菌在大豆叶葡萄糖培养基上生长最快，培养 10 天，菌落直径从 0.3cm 扩展到 3.04cm，而在 PDA 上仅扩展到 1.77cm，扩展速度提高 86%，但产孢量并不比 PDA 的多。最适宜产孢的培养基为小白菜

琼脂培养基和番茄琼脂培养基，培养 10 天后的产孢量分别为 105.1 和 83.3 万，而 PDA 的仅为 13.5 万，分别为 PDA 的 8 倍和 6 倍多，但菌丝在上述培养基上的生长，差异并不显著。病菌生长和产孢所要求的营养条件各不相同，在 PDA 上添加大豆叶汁液，产孢量则提高 2.6 倍，但对菌丝生长并无多大影响。

分生孢子萌发不需要增加其他营养，在蒸馏水里亦能萌发得很好，半小时就能萌发，经 3 小时的萌动准备阶段后，萌发率骤然上升，5 小时的萌发率从不到 30% 骤然上升到 90% 以上。添加蛋白胨营养液，对孢子萌发反而有抑制作用。

大豆灰斑病菌分生孢子在 10—40℃ 之间均能萌发，最适温度为 25—33℃，经 5 小时萌发率均在 90% 以上。但温度低于 15℃ 或高于 35℃ 时，菌丝生长非常缓慢，在人工定量接种到 PDA 上，培养 10 天，菌落仍不扩展，也未产孢。病菌生长和产孢的最适宜温度为 25—28℃。

Veiga, P. 等 (1979) 认为光暗交替比不断光照或黑暗更有利于大豆灰斑病菌产孢〔6〕，而我们的试验表明，在培养 10 天内，病菌的生长与产孢均以黑暗条件较好，连续光照有明显的抑制作用。黑暗条件也有利于孢子萌发，阳光直射对孢子萌发所产生的抑制更为明显，阳光直射可使孢子悬液温度提高，显然除光本身的影响外，高温也起作用。

大豆灰斑病菌对 pH 值的适应范围较广，在 pH 3—9 之间均能生长，但以 pH 5—6 最为适宜，而在 pH 6—7 下产孢量最多。作孢子萌发试验所用的柠檬酸磷酸盐缓冲溶液与蒸馏水比较，萌发率显著降低，孢子在 pH 7 的缓冲溶液中，经 6 小时萌发率仅为 62.2%，而在蒸馏水里，经 5 小时已达 90% 以上，显然柠檬酸磷酸缓冲溶液对孢子萌发有抑制作用。但 pH 值对病菌孢子萌发影响的试验是在相同的条件下进行的，从试验结果亦可看出 pH 6—8 之间对孢子萌发较为适宜，而以 pH 7 最好。

参 考 文 献

- [1] 许忠仁、李文茂, 1937, 黑龙江大豆灰斑病发生现状及防治对策, 《植物保护》3(2): 2—4
- [2] 田基植, 1987, 三江平原大豆灰斑病发生及其防治《黑龙江农业科学》, (6): 23—28
- [3] 黄桂湖、霍虹, 1984, 1934年大豆灰斑病菌生理小种鉴定结果初报《大豆科学》3(3): 231—234
- [4] 刘忠堂, 1987, 大豆抗灰斑病育种简报《大豆科学》2(1): 20
- [5] Yeh, C. C., Yorinori, J. T. and Sinclair, J. B. 1981, Multiple harvesting of *Cercospora* spp. conidia from culture plates (Abstr.) Phytopathology 71: 910
- [6] Veiga, P. and H. Kimat, 1979, Effect of culture media and light on sporulation of *Cercospora sojina*, Soybean Abstr. 2: 21

STUDIES ON THE BIOLOGICAL CHARACTERISTICS
OF *CERCOSPORA SOJINA*

Zhong Zhaoxi Wang Wei Zhang Guirong

(Northeast Agricultural College)

Abstract

The rate of *Cercospora sojina* growth increased 86% on soybean leaves glucose agar than on PDA. The amount of sporulation increased about 8 times on Chinese cabbage agar or 6 times on tomato agar than on PDA. The temperature for the growth and sporulation of the pathogen was 20—33°C, with optimum of 25—28°C. The pH values from pH4—9, with optimum pH 5—6 for growth and pH6—7 for sporulation. Complete darkness favoured growth and sporulation. Conidia of *Cercospora sojina* germinated well in distilled water. The germination could take place within half an hour. The rate of germination increased quickly within 3—4 hours and was above 90% within 5 hours. The germination temperature ranged 10—40°C, with an optimum of 28—30°C. Sun light treatments inhibited the germination of conidia. While darkness favoured it, pH6—8 was the optimum.