

大豆疫霉菌生物学性状的遗传与变异

侯巨梅¹, 刘 铜², 左豫虎³

(1. 景德镇高等专科学校生物与化学工程系, 景德镇 333000; 2. 上海交通大学农学院, 上海 201101; 3. 黑龙江八一农垦大学植物科技学院, 大庆 163319)

摘要 大豆疫霉菌引起的大豆疫病是大豆上危害严重的毁灭性病害之一。采用经典遗传学方法研究大豆疫霉菌单孢后代的菌丝生长速率、菌落形态、产孢量以及同宗配合性状的遗传变异, 以期为有效控制大豆疫病的发展和蔓延奠定基础。结果表明, 菌落形态、生长速率和同宗配合性状在单孢后代可稳定遗传, 控制上述性状的遗传因子是纯合的; 大豆疫霉菌的游动孢子产生能力在单孢后代发生连续性变异, 表明这种性状可能是数量遗传性状, 也可能控制这种性状的基因为杂合基因或细胞质遗传因子。研究结果初步揭示了大豆疫霉的遗传特征、遗传多样性及多样性产生的遗传学基础。

关键词 大豆疫霉菌; 菌落形态; 产孢能力; 同宗配合性状; 遗传变异

中图分类号 S435.651 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2007)06-0918-04

INHERITANCE AND VARIATION OF BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF *PHYTOPHTHORA SOJAE*

HOU Ju-mei¹, LIU Tong², ZUO Yu-hu³

(1. Department of Biology and Chemical Engineering, Jingdezhen Comprehensive College; Jingdezhen 333000; 2. College of Agriculture, Shanghai Jiaotong University; Shanghai 201101; 3. College of Plant Science and Technology, Heilongjiang August First Land Reclamation University, Daqing 163319)

Abstract *Phytophthora sojae* causes a major disease of soybean phytophthora root rot. This paper researched the inheritance and variation of growth rate, colony morphology, sporulation and homothallism of *Phytophthora sojae* with classic genetics method. The colony morphology, growth rate and homothallic characters were all steadily inherited in both single-zoospore and single-oospore progenies, which indicated that the genetic factors of controlling the three characters were homozygous. However, sporulation of zoospore of *P. sojae* showed successive variation in both single-zoospore and single-oospore progenies, which suggested that the character was controlled by heterozygous genotype, or cytoplasmic genetic factor. The results reveal the genetic basis of the inheritance characteristics and diversities of *Phytophthora sojae*.

Key words *Phytophthora sojae*; Colony morphology; Sporulation; Homothallism; Inheritance and variation

收稿日期: 2006-12-14

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(2002CD111406); 长江学者和创新团队发展计划资助项目(200558); 黑龙江省自然科学基金资助项目(TC2005-08)

作者简介: 侯巨梅(1979-), 女, 讲师, 硕士, 主要从事病原菌遗传变异和花卉组培研究。Tel: 13879829846; E-mail: amyliutong@163.com

大豆疫霉 (*Phytophthora sojae*) 为同宗配合疫霉种,是导致我国大豆疫霉根腐病的主要病原菌。关于该菌生物学性状的遗传国内外鲜有报道, Long 等^[1] 1975 年报道大雄疫霉大豆变种 (*P. megasperma* var. *sojae*) 的生长速率在游动孢子后代稳定遗传,而在有性生殖后代发生变异,认为该性状由细胞核杂合基因控制;1977 年又报道该变种某些菌株的生长速率在游动孢子后代发生变异与异核现象有关^[2]。然而迄今为止,有关该菌产孢量的遗传未见报道。本研究对大豆疫霉的生物学性状在单游动孢子后代和自交后代的遗传进行了研究,旨在揭示该疫霉种上述生物学性状的遗传特征,为进一步进行大豆疫霉菌的遗传和生物学研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

供试大豆疫霉分离物为 Ps411 (黑龙江省同江市)、Ps126 (黑龙江省虎林市)、Ps223 (黑龙江省密山市)、Hs-6 (黑龙江省饶河县),由黑龙江八一农垦大学植物免疫研究室提供^[3-4];PsSD 由山东省农科院李长松研究员惠赠。

1.2 单游动孢子无性系的建立

供试菌株在 CA (将 200 g 新鲜胡萝卜切成小片,加蒸馏水 500 mL,用组织捣碎机捣碎约 40 s,用 4 层纱布过滤去渣,补水至 1 000 mL,加入琼脂 20 g,在 121℃ 下高压蒸汽灭菌 15 ~ 20 min) 平板上生长 6 ~ 8 d 后,从菌落边缘切取 5 ~ 6 块大小约 8 mm × 8 mm 的菌块转入灭菌的培养皿内,加入灭菌水至正好没过表面,每 30 min 换一次水,换 4 次水后加入 15 mL Petri 培养液^[5],然后置于 25℃、黑暗条件下静置培养 22 ~ 24 h,可见大量孢子囊形成。再将盛有大量孢子囊的培养皿置于 4℃ 冰箱中 20 ~ 30 min 后,取出置于适温 (20 ~ 26℃) 下 30 min,即有大量游动孢子释放。

用微量加样器直接在浓度约 500 ~ 600 个 mL⁻¹ 的孢子悬浮液中吸取 120 ~ 150 μL,涂布于含利福平和安比西林各 50 μg mL⁻¹ 的 0.2% V₈ (取经离心的 V₈ 汁上清液 0.2 mL,加入去离子水 100 mL,琼脂粉 2 g,在 121℃ 下高压蒸汽灭菌 15 ~ 20 min) 平板上,置 25℃ 黑暗培养 12 ~ 24 h,取出培养皿置于显微镜下观察,切取带有单个已萌发游动孢子的琼脂块置于 CA 平板上,在 25℃ 黑暗中培养 2 ~ 3 d,可获

得纯净的单游动孢子无性系。

1.3 单卵孢群体建立^[6-7]

将供试菌株移植到 CA 平板上,用 pamfilm 膜密封培养皿,置 25℃ 黑暗培养 35 d 后,将有成熟卵孢子的培养基切成 3 ~ 4 mm 的小段,加入适量无菌水,使其刚好湿润浸没。先将其置于 -20℃ 冰箱中冷冻 18 ~ 24 h,随后放入 4℃ 冰箱中缓慢解冻,再经研钵充分研磨后,转入灭菌的离心管内,振荡处理 5 min,可将卵孢子从菌丝中分离下来。再以 1 000 r min⁻¹ 离心 5 min,倾去液体,然后加灭菌水反复冲洗离心 2 ~ 3 次,用灭菌的吸管将表面的菌丝剩余物吸净,离心获得卵孢子,用 10 mL 灭菌水重新悬浮卵孢子,即得到卵孢子悬浮液。

用微量加样器吸取卵孢子悬浮液涂布于含利福平和安比西林各 50 μg mL⁻¹ 的水琼脂培养基 (WA) (18 g 琼脂,加蒸馏水 1 000 mL,在 121℃ 下高压蒸汽灭菌 15 ~ 20 min) 平板上,置于 25℃、40 W 日光灯下连续照射培养 3 d 后,取出培养皿置于显微镜下观察,用医用解剖刀将单个卵孢子萌发形成的小菌落切下,移到 CA 平板上,置 25℃ 黑暗中培养 3 d,所获得的菌株即为单卵孢株。

1.4 菌落形态、菌丝生长速率和同宗配合性状的测定

从单孢分离物的菌落边缘打取直径为 8 mm 的菌饼接种到 CA 平板上。置 25℃ 黑暗条件下培养 2 ~ 3 d 后,采用十字交叉法每 2 d 测量一次菌落生长直径,测量 3 次,记录菌落形态,计算菌落生长速率。测量后的培养物平板用 parafilm 膜封口,置 25℃ 黑暗中继续培养 30 d 后,在显微镜下观察是否有卵孢子形成。每处理重复 3 次,以亲本菌株为对照。

1.5 产孢量测定

将分离所得的单孢株在 CA 平板上培养 8 ~ 10 d 后用直径为 8 mm 打孔器各打 5 个菌饼,置于培养皿内,参照建立单游动孢子无性系的方法获得孢子悬浮液,向悬浮液中加入 1 滴 0.1% 的苯胺蓝使游动孢子停止游动,用微量进样器吸取 5 μL 孢子悬浮液滴于干净载玻片上,在显微镜下镜检样本中游动孢子的总数,重复 5 次,计算 5 μL 悬浮液中游动孢子个数的平均值,按下面公式计算每毫升悬浮液中游动孢子的个数。

游动孢子悬浮液浓度 (个/mL) = 悬浮液中游动孢子平均个数 × 200

2 结果与分析

2.1 菌丝生长速率性状的遗传和变异

以供试的大豆疫霉野生型菌株为亲本进行单游动孢子分离,得到其单游动孢子株(ZG₀)群体。以ZG₀

单游动孢子株为亲本,建立单游动孢子第一代(ZG₁)群体和自交第一代(OG₁)单卵孢株群体。以ZG₁单游动孢子株为亲本,建立单游动孢子第二代(ZG₂)群体。分别测定各菌株各代单游动孢子株和单卵孢株在CA平板上(25℃,黑暗)的生长速率(表1)。

表1 大豆疫霉单孢后代菌落形态和生长速率

Table 1 Colony type and growth rates of zoospore and selfed oospore progeny of *P. sojae*

菌落 Isolate	代别 Generation	菌落类型 Colony type	单孢株数 No. of culture	生长速率 Growth rate/mm d ⁻¹			变异系数 CV/%	方差分析 Variance analysis		
				范围	平均	亲本		F	F _{0.05}	F _{0.01}
				Range	Average	Parent				
Ps411	ZG ₀	A	47	4.00-6.25	5.57	5.40	6.34	0.87	4.05	7.22
	ZG ₁	A	33	4.40-5.57	5.18	5.10	5.77	0.07	4.15	7.50
	ZG ₂	A	58	5.15-6.35	5.66	6.00	4.47	1.78	4.01	7.10
	ZG ₃	A	30	3.40-6.50	4.34	4.65	18.74	0.15	4.18	7.60
	ZG ₄	A	15	3.90-5.50	4.64	4.40	7.72	0.42	4.60	8.86
Ps126	OG ₁	A	47	4.35-6.35	5.63	5.75	6.37	0.11	4.05	7.22
	ZG ₀	A	49	4.65-6.65	6.06	6.50	5.13	2.00	4.04	7.19
	ZG ₁	A	12	5.85-6.85	6.42	6.85	4.46	2.11	4.84	9.65
PsSD	OG ₁	A	50	5.85-8.25	6.83	6.35	8.49	0.67	4.04	7.18
	ZG ₀	A	49	6.00-7.50	6.48	6.35	5.05	0.16	4.04	7.19
Ps223	ZG ₀	A	46	3.50-6.00	5.06	5.20	10.68	0.06	4.06	7.23
	ZG ₀	A	50	4.65-7.00	6.41	6.35	6.24	0.02	4.04	7.18

ZG₀、ZG₁、ZG₂、ZG₃、ZG₄分别表示单游动孢子第一代、第二代、第三代、第四代和第五代;OG₁表示单卵孢第一代;A 菌落圆形,边缘整齐光滑,菌丝分布均匀,气生菌丝较多

ZG₀、ZG₁、ZG₂、ZG₃ and ZG₄ stand for the first, second, third, fourth and fifth single zoospore generation; OG₁ stand for the first single oospore generation; A - Colony rotundity and margin regularity, mycelioid colony uniform distribution and aerial mycelium grow hevery

结果表明各菌株各代单孢株的生长速率均十分相似,群体内变异系数在4.47%~18.74%之间;经方差分析,供试菌株在各代单孢株群体内菌株间及其与亲本间生长速率无显著差异。以上结果表明菌丝的生长速率在游动孢子后代和自交后代可稳定遗传,即控制上述性状的遗传因子是纯合的。

2.2 菌落形态的遗传与变异

分别测定各菌株各代单游动孢子株和单卵孢株在CA平板上(25℃,黑暗)生长的菌落形态。结果表明(表1),各代单游动孢子株和单卵孢株的菌落形态与亲本相同,菌落圆形,边缘整齐光滑,菌丝分布均匀,气生菌丝较多。说明大豆疫霉菌株的菌落形态在无性及自交后代均可稳定遗传,控制该性状的遗传因子是纯和的。

2.3 同宗配合性状的遗传

分别测定了来自大豆疫霉菌株野生型Ps411和Ps126的同宗配合性状在单游动孢子无性系和单卵孢后代的遗传稳定性。Ps411菌株连续测定5代单游动

孢子后代和1代单卵孢后代,Ps126菌株测定了2代单游动孢子后代和1代单卵孢后代。结果表明(表2),大豆疫霉菌株的同宗配合性状在无性后代和自交后代中均未出现变异,证明其同宗配合性状遗传稳定。但卵孢子产生量在不同菌株间及同一菌株的不同单孢后代个体间存在较大差异。这一结果与王源超等^[8-9]对苎麻疫霉的研究结果一致,证明大豆疫霉的同宗配合性状由纯合的核遗传基因控制。

2.4 产孢量的遗传和变异

测定了供试菌株的产孢能力在单游动孢子无性系和自交单卵孢后代的遗传稳定性,结果列于表2。不同菌株间、同一后代群体内菌株间、各后代单孢株与亲本间的产生游动孢子数量明显不同,各代群体内单孢株产生游动孢子的数量的变异系数在31.6%~127.6%之间,变异显著;但方差分析结果显示,除Ps411菌株的单卵孢株第一代(OG₁)群体内各单孢的产孢能力与亲本菌株表现极显著差异($F = 18.12 > F_{0.01} = 7.22$)外,其他各菌株后代与亲

本间并无显著差异。在 Ps411 菌株的 OG₁ 代的 47 个单孢株的产孢量均低于亲本,其中仅有 1 株产孢量与亲本接近,为 3 850;有 2 株产孢量低于亲本,有 44 株产孢量显著低于亲本。

表 2 大豆疫霉单孢后代产孢量测定

Table 2 Sporulation capacity of single-zoospores and single-oospores of *P. sojae*

菌株 Isolate	代别 Progeny	单孢株数 No. of culture	游动孢子产孢量/个 mL ⁻¹ Sporulation capacity of Zoospore			变异系数 CV/%	方差分析 Variance analysis		
			范围 Range	平均 Average	亲本 Parent		F	F _{0.05}	F _{0.01}
Ps411	ZG ₀	47	1200 - 24100	7837.2	3500	73.1	0.56	4.05	7.22
	ZG ₁	33	1000 - 4205	2040.9	1350	31.6	1.11	4.15	7.50
	ZG ₂	58	50 - 925	312.5	550	67.8	1.23	4.01	7.10
Ps126	OG ₁	47	100 - 3850	741.5	3900	99.0	18.12**	4.05	7.22
	ZG ₀	49	50 - 220	641.0	550	67.9	0.04	4.04	7.19
PsSD	OG ₁	50	50 - 14750	2376.5	600	111.9	0.44	4.04	7.18
	ZG ₀	49	100 - 15900	2893.9	3400	101.1	0.03	4.04	7.19
Ps223	OG ₁	46	50 - 2450	515.2	700	109.7	0.10	4.06	7.23
	ZG ₀	46	100 - 9800	1359.8	300	127.6	0.36	4.06	7.23
Hs - 6	ZG ₀	50	750 - 49200	14200.0	1600	92.0	0.91	4.04	7.18
	ZG ₀								

ZG₀、ZG₁、ZG₂ 和 OG₁ 分别表示单游动孢子第一代、第二代、第三代和自交第一代

ZG₀、ZG₁、ZG₂ and OG₁ stand for the first, second, third single zoospore generation and the first selfed progeny

从表 2 还可看出,后代单孢群体产孢能力明显下降,对来自 Ps411 菌株的 ZG₀、ZG₁、ZG₂、OG₁ 群体的产孢能力进行 F 检验,ZG₀ 和 ZG₁ 两个群体的游动孢子产孢量的 F 检验结果为, $F = 78.78 > F_{0.01} (47, 33) = 2.21$; ZG₁ 和 ZG₂ 两个群体的游动孢子产孢量的 F 检验结果为, $F = 9.28 > F_{0.01} (33, 58) = 2.02$; ZG₁ 和 OG₁ 群体的产孢能力的 F 检验结果为, $F = 0.77 > F_{0.05} (33, 47) = 0.57$, 表明游动孢子产生能力在亲本群体与后代群体间存在极显著差异,亲本群体游动孢子产量平均值远大于后代群体产孢量的平均值,产孢能力下降的原因尚不清楚。上述结果表明,大豆疫霉的游动孢子产生能力在无性和自交后代中均发生变异。

ZG₀ 代单游动孢子群体产孢能力变异程度远远大于 ZG₁ 代和 OG₁ 代,由于 ZG₀ 代单游动孢子群体分离自野生型菌株,说明野生型菌株中的单游动孢子存在异核性或细胞质的异质性。ZG₁ 群体、ZG₂ 群体和 OG₁ 代群体均分离自单游动孢子,但游动孢子产量依然有显著的差异,证明控制游动孢子产量的遗传因子可能是杂合的核基因或细胞质基因。

3 结论与讨论

关于同宗配合疫霉菌生物学性状的遗传与变

异,国外已有的报道均认为其生长速率、菌落形态等性状通常在无性或自交后代发生变异^[10]。Boccas^[11] 报道丁香疫霉 (*P. syringae*) 的生长速率在游动孢子后代稳定遗传,而在有性生殖后代发生变异,认为该性状由细胞核杂合基因控制。然而,国内对恶疫霉、苎麻疫霉、马铃薯晚疫病病菌的生物学性状进行的研究结果表明^[12-16],在无性及自交后代均可稳定遗传,提示控制上述性状的遗传因子是纯合的。

研究发现供试的大豆疫霉菌株在各代单孢株群体内菌株间及其与亲本间生长速率无显著差异,其菌落形态、生长速率和同宗配合性状在无性和自交后代均可以稳定遗传,说明供试菌株的上述性状受纯合的核基因控制。不同菌株间、同一后代群体内菌株间、各后代单孢株与亲本间的产生游动孢子数量明显不同,变异显著;可见大豆疫霉的游动孢子产生能力在无性和自交后代中均发生变异。由于 ZG₀ 代单游动孢子群体分离自野生型菌株,说明野生型菌株中的单游动孢子存在异核性或细胞质的异质性。ZG₁ 群体、ZG₂ 群体和 OG₁ 代群体均分离自单游动孢子,但游动孢子产量依然有显著的差异,证明控制大豆疫霉菌游动孢子产量的遗传基因可能是杂合的核基因或细胞质基因。

(下转 929 页)

3 讨论

种群的空间分布格局是物种与环境长期相互适应和相互作用的结果,取决于物种之间的生物学特性以及物种和群落环境之间的依赖关系,如竞争、食物、水分、生存空间等。大量研究表明,当负二项分布模型中代表聚集程度的 k 值变小(即聚集程度增强)时,避难所增大,从而使种群稳定性加强^[10],故聚集分布是绝大多数自然种群的稳定分布格局。而且种群的聚集分布可以使种群在某一环境中形成优势,抵抗外来种的入侵和定居,从而维持种群的稳定和续存^[11]。筛豆龟蜡成虫和若虫的分布型取决于卵的分布型,而卵的分布格局显然与成虫的聚集分布有关。采用频次分布和若干种群扩散指数检验,筛豆龟蜡成若虫和卵的种群空间分布型均属聚集分布,为具有公共 k 值的负二项分布,这也与野外实际观察到的高度聚集现象相一致。

致谢:南京农业大学植保学院李保平教授提出修改意见,在此深表感谢。

参 考 文 献

- [1] 张友廷,杜相革,董民,等. 筛豆龟蜡卵寄生蜂田间发生调查初报[J]. 昆虫知识,2003,46(5):43-45.
 - [2] 吴梅香,吴珍泉,华树妹. 筛豆龟蜡及其2种卵寄生蜂若干生物学特性的初步研究[J]. 福建农林大学学报(自然科学版),2006,35(2):147-150.
 - [3] 邢光南,赵团结,盖钧益. 大豆资源的筛豆龟蜡 *Megacopta cribraria* 抗性鉴定[J]. 作物学报,2006,32(4):491-496.
 - [4] 王植杏,王华弟,陈桂华,等. 筛豆龟蜡发生规律及防治研究[J]. 植物保护,1996,22(3):7-9.
 - [5] 李典谟,丁岩钦. 介绍几种昆虫分布型理论分布的计算[J]. 昆虫知识,1965,9(5):310-317.
 - [6] 谢钦铭,梁广文,曾玲,等. 荔枝枝卵的空间分布型和抽样技术[J]. 热带作物学报,2001,22(3):40-43.
 - [7] 唐启义,冯明光. DPS 数据处理系统-实验设计、统计分析 & 数据挖掘[M]. 北京:科学出版社,2002.
 - [8] 赵志模,周新远. 生态学引论-害虫综合防治的理论及应用[M]. 重庆:科学技术出版社重庆分社,1984:104-120.
 - [9] 李天生,周国法. 昆虫种群距离聚集度指标的研究[J]. 生态学报,1991,11(4):345-348.
 - [10] Crawley M. Population dynamics of natural enemies and their prey [M]. In: Crawley M. Ed. Natural Enemies. London: Blackwell Scientific Publications, 1992,40-89.
 - [11] 于新文,刘晓云. 昆虫种群空间格局的研究方法评述[J]. 西北林学院学报,2001,16(3):83-87.
-
- (上接 921 页)
- [1] Long M, Keen N T, Ribeiro O K, et al. *Phytophthora magesperma* var. *sojae*: Development of wild-type strains for genetics research [J]. Phytopathology, 1975, 65:592-597.
 - [2] Long M, Keen N T. Evidence for heterokaryosis in *Phytophthora magesperma* var. *sojae* [J]. Phytopathology, 1976, 67:670-674.
 - [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] 左豫虎,臧忠婧,韩文革,等. 大豆疫霉菌的土壤诱集分离检测技术研究[J]. 黑龙江八一农垦大学学报,2001,13(2):7-13.
 - [5] 左豫虎,臧忠婧,刘惕若. 影响大豆疫霉菌游动孢子产生的条件[J]. 植物病理学报,2001,31(3):241-245.
 - [6] 左豫虎,臧忠婧,韩文革,等. 影响大豆疫霉菌卵孢子萌发的条件[J]. 大豆科学,2002,21(2):101-105.
 - [7] 罗加风,黄国明. 大豆疫病卵孢子萌发的显微观察[J]. 植物检疫,2001,15(1):28-29.
 - [8] Hendrix J W. Sterol induction of reproduction and stimulation of growth of *Pythium* and *Phytophthora* [J]. Science, 1964, 144: 1028-1029.
 - [9] 王建营,周永春,郑小波. 苾麻疫霉菌异宗配合变异株交配型的遗传[J]. 南京农业大学学报,2001,22:37-41.
 - [10] 王源超,郑小波,陆家云. 苾麻疫霉菌生长速率菌落形态同宗配合形状遗传研究[J]. 南京农业大学学报,1998,28(2):183-188.
 - [11] Boccas B. Contribution a l'etude du cycle chez les *Phytophthora* [J]. C R Seances Acad Sci Ser D. 1972,257:663-667.
 - [12] 杨志辉,朱华杰,郭强,等. 马铃薯晚疫病菌单孢分离物生物学特性的初步研究[J]. 菌物系统,2003,22(1):148-152.
 - [13] 高智谋,郑小波,陆家云. 恶疫霉生物学性状的遗传研究[J]. 安徽农业大学学报,1999,26(1):50-53.
 - [14] 高智谋,郑小波,陆家云. 苾麻疫霉菌生物学性状遗传与变异[J]. 菌物系统,1999,18(1):35-43.
 - [15] 王建营,郑小波. 恶疫霉生长速率与同宗配合性状的遗传与变异[J]. 南京农业大学学报,2001,24(2):32-36.
 - [16] 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.