

# 从老化病组织中高效分离大豆疫霉菌的方法

宁 峰<sup>1,2</sup>,朱晓莹<sup>1</sup>,殷丽华<sup>1</sup>,左豫虎<sup>3</sup>,单卫星<sup>1,4</sup>

(1 西北农林科技大学 植物保护学院,陕西 杨凌 712100;2 广东茂名市农业局,广东 茂名 525000;

3 黑龙江八一农垦大学 植物科技学院,黑龙江 大庆 163319;4 陕西省农业分子生物学重点实验室,陕西 杨凌 712100)

**[摘要]** 【目的】建立从老化病组织中高效分离大豆疫霉菌的方法,为大豆疫霉菌的群体遗传研究奠定基础。【方法】2006~2007 年分别调查黑龙江和新疆大豆根腐病的发生情况,分别用病组织直接分离法和新建的病组织浸泡分离法从采自黑龙江和新疆病样中分离大豆疫霉菌,统计分离率。【结果】建立的病组织浸泡法为:用 NaOH 处理采集的病样,通过镜检卵孢子的方法确定大豆疫霉病,排除镰刀菌、丝核菌或其他杂菌的干扰;浸泡病组织刺激卵孢子的萌发,用大豆叶碟诱集游动孢子侵染,下胚轴接种染病叶碟至感病大豆,最后从染病大豆胚轴分离病菌。采用此方法从采自黑龙江和新疆的 205 个已确认为大豆疫霉菌侵染的根腐病病样中,获得共计 145 个分离物,直接分离法和组织浸泡法平均分离率分别为 21.4%和 49.3%,总体分离率平均为 70.7%。【结论】建立了从老化病组织中高效分离大豆疫霉菌的方法,降低了分离成本。

**[关键词]** 大豆疫霉菌;卵孢子;叶碟诱集;病菌分离方法

**[中图分类号]** S435.651

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2009)05-0139-05

## A method for high-efficiency isolation of *Phytophthora sojae* from heavily infected soybean tissues

NING Feng<sup>1,2</sup>, ZHU Xiao-ying<sup>1</sup>, YIN Li-hua<sup>1</sup>, ZUO Yu-hu<sup>3</sup>, SHAN Wei-xing<sup>1,4</sup>

(1 College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Guangdong Maoming Municipal Bureau of Agriculture, Maoming, Guangdong 525000, China;

3 Plant Science and Technology Department, Heilongjiang August First Reclamation University, Daqing, Heilongjiang 163319, China;

4 Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** 【Objection】 A method which could isolate *Phytophthora sojae* from heavily infected soybean tissues effectively was established, making it possible for large-scale isolation of *P. sojae* for population genetic analysis. 【Method】 From 2006 to 2007, investigation of root rot of soybean was made in Heilongjiang and Xinjiang individually. Directly isolated method and indirectly isolated method were used to isolate *P. sojae* from soybean samples respectively collected from Heilongjiang and Xinjiang, then the percentage of isolation was calculated. 【Result】 Indirectly isolated method: NaOH treatment was used to exclude soybean root and stem rot caused by *Fusarium*, *Pythium*, *Rhizoctonia* and other pathogens by softening collected samples and checking for the presence of *Phytophthora sojae* oospores. The diseased soybean tissues confirmed to contain *Phytophthora* were soaked with soil extract and baited with susceptible soybean leaf. The infected soybean discs were hypocotyl-inoculated on susceptible soybean seedlings and the freshly diseased tissues were used to isolate *P. sojae* directly. The established method was successfully used to obtain 145 *P. sojae* isolates from 205 soybean samples collected from both Heilongjiang and Xinjiang that were con-

\* [收稿日期] 2008-07-02

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30571204);教育部新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-05-0856)

[作者简介] 宁 峰(1983-),男,河南平顶山人,硕士,主要从事植物免疫学研究。E-mail:ningfine@gmail.com

[通信作者] 单卫星(1967-),男,新疆伊犁人,教授,博士生导师,主要从事植物免疫学研究。E-mail:Weixing.Shan@gmail.com

firmed to be infected with *P. sojae*. The average percentage of directly isolated method and indirectly isolated method was 21.4% and 49.3% respectively, and the average total percentage of isolation was 70.7%.

**【Conclusion】** The newly established method made it possible to isolate *P. sojae* from heavily infected soybean tissues with high efficiency, and the cost of isolation was reduced.

**Key words:** *Phytophthora sojae*; oospore; leaf baiting; pathogen isolation

由大豆疫霉(*Phytophthora sojae*)引起的大豆疫霉根腐和茎腐病,是大豆的毁灭性病害之一,因此长期以来被列为我国重要的检疫对象。自从沈崇尧等<sup>[1]</sup>于1991年首次在我国东北和北京分离获得大豆疫霉菌以来,一些研究者先后在我国的其他地区发现大豆疫霉病的存在<sup>[2-8]</sup>,表明该病害有逐步扩展的趋势,严重威胁我国大豆的可持续生产。除大豆疫霉菌外,镰刀菌(*Fusarium*)和腐霉菌(*Pythium*)亦可引起大豆根腐病<sup>[9-10]</sup>,而且这些病害的症状在作物生长后期非常接近。目前,分离大豆疫霉菌的方法主要有病组织直接分离法<sup>[4]</sup>、带菌土壤浸泡法<sup>[11]</sup>等,其中病组织直接分离法对采集的病样要求比较高,只能从发病症状明显、新鲜的病样上分离到大豆疫霉菌;带菌土壤浸泡法则易受到土壤中其他杂菌的影响,影响分离效率。老化、腐烂的病组织严重复合感染许多真菌,分离纯化其中的大豆疫霉菌十分困难,而有关这方面研究还较少。本试验建立了从老化病组织中高效率鉴定和分离大豆疫霉菌的方法,旨在为开展大豆疫霉菌的群体遗传研究及揭示病害的传播和发生发展规律奠定基础,为建立有效的病害防治方法提供依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 病害标样的采集 于2006-07、2007-07在黑龙江(虎林、鸡东、鸡西、密山、林口、宝清、佳木斯),2007-07在新疆部分地区(伊犁、石河子)的大豆田块调查大豆根腐病的发生情况,采集零星发病的根茎受害明显的大豆苗,分装于纸袋中直接带回或通过邮寄运回实验室。

1.1.2 分离和培养材料 CA培养基(5 mL澄清的胡萝卜汁,10 mg  $\beta$ -谷甾醇( $\beta$ -sterol),0.1 g  $\text{CaCO}_3$ ,15 g 琼脂,加蒸馏水至1 L,用HCl或NaOH调pH至6.5);土壤浸出液(取田间土壤50 g,加150 mL蒸馏水,搅拌后放置3 h,待土壤上层溶液变澄清,然后取上清液,经离心和抽滤器抽滤灭菌,置于试剂瓶中保存备用);盐溶液(5 mmol/L  $\text{KNO}_3$ ,10 mmol/L  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ,4 mmol/L  $\text{MgSO}_4$ ,0.02 mmol/L  $\text{FeSO}_4$  ·

7H<sub>2</sub>O和0.02 mmol/L Na<sub>2</sub>EDTA)。

### 1.2 分离方法

1.2.1 病组织直接分离法 用体积分数70%酒精快速擦洗病组织表面,然后用无菌蒸馏水冲洗干净,用灭菌刀片切取病健交界组织,放置在CA培养基上,25℃下倒置培养2~3 d,观察菌落形态并且在光学显微镜下检查卵孢子的产生情况,以已知的大豆疫霉菌为参照菌系。经显微镜确证卵孢子产生后,转移少量菌落边缘菌丝至新的CA培养基上,25℃、黑暗条件下进行纯化培养,培养3~5 d,统计直接分离法分离率:

直接分离法分离率/%=(直接分离法分离到的大豆疫霉菌数目÷含有卵孢子的病样数)×100%。

1.2.2 病组织浸泡分离法 (1)镜检疫霉菌卵孢子。从发病大豆苗上切小片老化病组织(<100 mg),放入0.5 mL离心管中,加入200  $\mu\text{L}$  30 g/L NaOH,沸水中水浴15~30 min(时间视病组织大小和薄厚而定)以软化病组织。将软化的病组织经压片,直接在光学显微镜下观察疫霉菌卵孢子的存在情况。

(2)处理老化病组织。用体积分数70%酒精快速擦洗病组织表面,然后用无菌蒸馏水冲洗干净,取0.5 g病组织,用手术刀片切碎,放入2 mL离心管中,依次加入1 mL土壤浸出液和盐溶液浸泡,在25℃条件下黑暗培养20 d左右。

(3)诱集病菌游动孢子。将1.2.2(2)中老化病组织在25℃、黑暗条件下培养20 d后,向离心管中加入新鲜的大豆叶碟(选用培养7~10 d易感病的大豆品种、直径0.5 cm的叶碟)10~15片,继续在25℃、黑暗条件下过夜培养;第2天将叶碟取出,放入60 mm培养皿,加入4 mL无菌蒸馏水,在25℃、黑暗条件下过夜培养。

(4)接种大豆幼苗下胚轴。将在显微镜下观察到边缘着生有梨型孢子囊的叶碟挑出,采用下胚轴伤口接种法,将叶碟置于7~10 d的大豆幼苗下胚轴纵向伤口内。用无菌蒸馏水喷洒大豆植株,用保鲜袋包裹大豆植株,保证大豆疫霉菌侵染时的湿润环境,在25℃、光照条件下培养2~5 d。

(5) 分离和纯化病菌。对表现大豆疫霉菌侵染典型症状的发病大豆植株,采用病组织直接分离法获得大豆疫霉菌。下胚轴发病处用体积分数70%酒精快速擦洗,用无菌蒸馏水将酒精擦洗干净,取病健交接处,置于加有10 μg/mL利福平和200 μg/mL氨基青霉素的CA培养基上,25℃下倒置培养2~3 d,观察菌落形态并且在光学显微镜下检查卵孢子产生情况,以已知的大豆疫霉菌为参照菌系。在显微镜下观察确证卵孢子产生后,转移少量菌落边缘菌丝至新的CA培养基上进行纯化培养,培养条件同1.2.1,统计组织浸泡法分离率:

组织浸泡法分离率/%=(组织浸泡法分离到的大豆疫霉菌数目÷含有卵孢子的病样数)×100%。

## 2 结果与分析

大豆疫霉菌的侵染可造成幼苗猝倒或青枯,在大豆苗期易于鉴别发病情况,而且发病植株多为初侵染造成,因此从零星发病的田块分离病菌,适合分

析其群体遗传结构的特征。由于大豆疫霉菌是同宗配合种,致病过程中在短时间内可产生大量的卵孢子。疫霉菌的卵孢子特征明显,易于鉴别,因此通过检查染病组织中卵孢子的存在情况,确定病样是否感染大豆疫霉菌。

### 2.1 大豆疫霉菌卵孢子的鉴定结果

从表1可以看出,在光学显微镜检下,仅有46.6%的病样中存在疫霉菌卵孢子,其他病样大多是由镰刀菌(*Fusarium*)、腐霉菌(*Pythium*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)等单独侵染或复合侵染造成,这些病菌侵染大豆后,表现的症状与大豆疫霉菌侵染症状较为相似,尤其在干老的病株上不能明显区分。

与2007年相比,2006年在黑龙江采集的病样受大豆疫霉菌侵染的比率较高,这是因为2006年采集病样期间降水较多,适宜大豆疫霉菌侵染大豆发病。

表1 大豆疫霉根腐病病样的采集及疫霉菌卵孢子的镜检结果

Table 1 Sampling year and location of *Phytophthora* root rot of soybean and result of the presence of *P. sojae* oospores

采集年份 Sampling year	采集地点 Sampling site	病样数 Number of Samples	含有卵孢子的病样数 Number of Samples containing oospores	分离到大豆疫霉菌的病样数 Number of <i>P. sojae</i> isolated	大豆疫霉根腐病比率/% Percentage of samples infected with <i>P. sojae</i>
2006	黑龙江虎林 Hulin, Heilongjiang	42	33	23	78.6
2006	黑龙江鸡东 Jidong, Heilongjiang	11	5	4	45.5
2006	黑龙江鸡西 Jixi, Heilongjiang	2	0	0	0
2006	黑龙江密山 Mishan, Heilongjiang	9	5	4	55.6
2006	黑龙江林口 Linkou, Heilongjiang	15	12	10	80
2007	黑龙江宝清 Baoqing, Heilongjiang	244	114	77	46.7
2007	黑龙江佳木斯 Jiamusi, Heilongjiang	18	4	2	22.2
2007	新疆伊犁 Yili, Xinjiang	31	16	12	51.6
2007	新疆石河子 Shihezi, Xinjiang	68	16	13	23.5
	总计 Total	440	205	145	—
	平均 Average	—	—	—	46.6

注:大豆疫霉根腐病比率/%=(含有卵孢子的病样数÷病样数)×100%。

Note: Percentage of samples infected with *P. sojae*/%= (Number of samples containing oospores ÷ Number of samples) × 100%.

### 2.2 直接分离法和组织浸泡法的分离结果

采用病组织直接分离法,分离病健交界处明显的新鲜病样,简单的分离技术和培养条件即可取得较好的分离效果,为后续的叶碟诱集分离方法奠定基础。新鲜大豆病样保存条件合适时,一般在采集后一周内可用于大豆疫霉菌的直接分离。采用直接

分离法,2006年从黑龙江省采集的大豆疫霉菌病样获得了较高的分离率,达49.1%,这是由于2006年采集病样时降水较多,适宜大豆疫霉侵染发病;在2007年采集病样时降水少,所采集的病样被镰刀菌、腐霉菌以及丝核菌复合侵染发病的较多,而大豆疫霉菌侵染发病的病样少,分离率低(表2)。

表 2 直接分离法和组织浸泡法分离大豆疫霉菌的结果

Table 2 Result of *P. sojae* isolation by direct and indirect methods

采集年份 Sampling year	采集地点 Sampling location	含卵孢子的 病样数 Number of Samples containing oospores	分离到大豆疫霉菌的数目 Number of <i>P. sojae</i> isolations		分离率/% Percentage		总分离率/% Percentage of total isolation
			直接分离法 Directly isolated method	组织浸泡法 Indirectly isolated method	直接分离法 Direct isolation method	组织浸泡法 Indirect isolation method	
2006	黑龙江 Heilongjiang	55	27	14	49.1	25.4	74.5
2007	黑龙江 Heilongjiang	118	11	68	9.3	57.6	66.9
2007	新疆 Xinjiang	32	6	19	18.7	59.4	78.1
	总计 Total	205	44	101	—	—	—
	平均 Average	—	—	—	21.4	49.3	70.7

注:总分离率/%=直接分离法分离率+组织浸泡法分离率。

Note: Percentage of total isolation/%= Percentage of direct isolation+ Percentage of indirect isolation.

由于发病条件的差异和病样采集及运输,许多病样会复合感染有其他杂菌,而无明显的病健交界组织,使得病组织直接分离方法对大多数病样难以奏效。采用病组织浸泡分离法,对不同年份(2006~2007)采自不同地区(黑龙江、新疆)的老化病样可获得较高分离率,平均为 49.3%(表 2),有效地排除了其他杂菌对病菌分离纯化的影响。

结合 2 种分离方法,可有效地从采集的病样中分离纯化大豆疫霉菌,对不同年份采自不同地区的病样获得了较高的分离率,平均为 70.7%(表 2)。

### 3 讨论

病菌的分离和纯化,是认识病原菌群体遗传特征、揭示病害传播和发生发展规律的基础。由于老化、腐烂的病组织往往复合感染许多真菌,如镰刀菌和腐霉菌,使得大豆疫霉菌的分离纯化十分困难,分离效率低下。本试验建立了高效率鉴定和分离大豆疫霉菌的方法,对 2006~2007 年采自不同地区(黑龙江、新疆)的病样获得的总分离率为 66.9%~78.1%,平均为 70.7%。

从病组织直接分离病原菌,对病样的要求比较高,分离标样的保存时间不超过 24 h,采集发病典型的、新鲜的材料,才有可能获得较好的分离效果<sup>[12]</sup>。本试验发现,将新鲜病组织置于 4℃ 条件下保存 7 d,仍可获得较高频率的分离效果。选择性培养基的使用,在大豆疫霉菌的分离上应用较多,但是老化的病样由于后期受其他病菌的复合侵染,即使采用选择性培养基也不易分离到大豆疫霉菌。

从带菌土壤中分离大豆疫霉菌也是常用的方法之一,但由于土壤中存在多种腐霉菌,且操作困难,

分离效率不高<sup>[13]</sup>。此外,大豆疫霉菌可在土壤中存活多年,病菌群体极可能存在较高水平的多样性,须做单胞分离。由此可知,病组织中分离病菌具备一定的优势,容易获得遗传上纯化的分离物。

本研究首先用 NaOH 处理病样,将病组织软化透明,以观察病组织中是否含有卵孢子,排除了由丝核菌、镰刀菌或其他杂菌侵染的大豆病样,以减少分离过程中的工作量和不必要的浪费。由于大豆疫霉菌属同宗配合,在离体培养和侵染大豆过程中可迅速产生大量的卵孢子<sup>[14]</sup>,本研究以土壤浸出液(土壤浸出液用于模拟卵孢子萌发时的土壤环境,将土壤浸出液抽滤灭菌,可以排除土壤中杂菌对试验的影响)和盐溶液浸泡含有卵孢子的病组织,用感病大豆叶碟诱集游动孢子,进而用染病的叶碟接种感病大豆幼苗的下胚轴,利用大豆对环境微生物的高度选择性,最后从新鲜的病组织中高效地分离出了纯化的大豆疫霉菌。

志谢:承蒙新疆石河子大学的李国英教授馈赠部分病样,黑龙江 597 农场的王忠玉老师在采样时提供大力协助,特此一并志谢!

### [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.  
Shen C Y, Su Y C. Discovery and preliminary study of *Phytophthora sojae* in China [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 1991, 21(4): 298. (in Chinese)
- [2] 周肇蕙,严进,苏彦纯,等. 大豆疫霉的检疫研究——病原菌的分离鉴定 [J]. 植物检疫, 1995, 9(5): 257-261.  
Zhou Z H, Yan J, Su Y C, et al. Study on quarantine of *Phytophthora sojae* -isolation and identification of pathogen [J]. Plant Quarantine, 1995, 9(5): 257-261. (in Chinese)
- [3] 李宝英,马淑梅. 大豆疫霉病研究初报 [J]. 大豆科学, 1996, 15

- (2):164-165.
- Li B Y, Ma S M. Preliminary study of *Phytophthora sojae* [J]. Soybean Science, 1996, 15(2):164-165. (in Chinese)
- [4] 王晓鸣, 朱振东, 马淑梅, 等. 大豆疫霉选择性分离技术研究 [J]. 植物病理学报, 1998, 28(1):78.
- Wang X M, Zhu Z D, Ma S M, et al. Study on selective isolation technique of *Phytophthora sojae* [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 1998, 28(1):78. (in Chinese)
- [5] 黄振刚, 靳相成, 马玉华, 等. 呼伦贝尔盟大豆疫病菌病原菌鉴定 [J]. 内蒙古农业科技, 1999(4):211.
- Huang Z G, Jin X C, Ma Y H, et al. Identification of *Phytophthora sojae* in Holonboir League [J]. Inner Mongolia agricultural science and technology, 1999(4):211. (in Chinese)
- [6] 王佐魁, 陈申宽, 闫任沛, 等. 呼盟农区大豆新病害——大豆疫病 [J]. 内蒙古农业科技, 2000(3):43-44.
- Wang Z K, Chen S K, Yan R P, et al. A new soybean disease in Holonboir League——*Phytophthora sojae* [J]. Inner Mongolia Agricultural Science and Technology, 2000(3):43-44. (in Chinese)
- [7] 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):236-240.
- Zhu Z D, Wang X M, Wang H B, et al. Identification and race of *Phytophthora sojae* isolates collected in Mengcheng, Anhui province [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2001, 31(3):236-240. (in Chinese)
- [8] 陈庆河, 翁启勇, 王源超, 等. 福建省大豆疫病菌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.
- Chen Q H, Weng Q Y, Wang Y C, et al. Identification and sequencing of ribosomal DNA-ITS of *Phytophthora sojae* in Fujian province [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2004, 34(2):112-116. (in Chinese)
- [9] 马汇泉. 大豆根腐病病原种类鉴定及其生物学研究 [J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 1988(2):115-121.
- Ma H Q. Studies on the identification and biology of *Phytophthora* root rot of soybean [J]. Journal of Heilongjiang August First Land Reclamation University, 1988(2):115-121. (in Chinese)
- [10] 李长松. 大豆根腐病研究的概况 [J]. 中国油料, 1993(1):77-81.
- Li C S. Profile of the study of *Phytophthora* root rot of soybean [J]. China oil crops, 1993(1):77-81. (in Chinese)
- [11] 朱振东, 王化波, 王晓鸣, 等. 一种土壤中大豆疫霉菌分离新方法 [J]. 菌物系统, 2003, 22(1):142-147.
- Zhu Z D, Wang H B, Wang X M, et al. A new method of isolating *Phytophthora sojae* from soil [J]. Mycosystema, 2003, 22(1):142-147. (in Chinese)
- [12] 李宝英. 大豆疫霉病的症状与分离技术 [J]. 植物保护, 1997, 23(4):44-45.
- Li B Y. Symptom and isolation technique of *Phytophthora sojae* [J]. Plant protection, 1997, 23(4):44-45. (in Chinese)
- [13] Schmitthenner A F, Bhat R G. Useful methods for studying *Phytophthora* in the laboratory [J]. OARDC Special Circular, 1994, 143.
- [14] 郑小波. 疫霉菌及其研究技术 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1997.
- Zheng X B. *Phytophthora* and research technique [M]. Beijing: China Agriculture Publishing House, 1997. (in Chinese)