

油菜菌核病菌秋季与春季萌发菌株生物学特性的比较

余秋玉 范璇 张静 李国庆

华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 通过室内和田间试验, 观察并比较采自湖北省咸宁市核盘菌秋季萌发菌株与春季萌发菌株的生物学特性。结果表明: 9个秋季萌发菌株(aSs-1至aSs-9)和9个春季萌发菌株(sSs-1至sSs-9)在菌丝生长速率、菌核产量、菌核大小和对油菜的致病力等方面均无显著差异($P > 0.05$); 室内和田间菌核的萌发均受菌核形成温度和诱导菌核萌发温度的影响, 高温形成的菌核易于萌发; 核盘菌秋季萌发菌株和春季萌发菌株在菌核萌发特性方面存在明显差异。

关键词 油菜; 核盘菌; 菌株; 菌核

中图分类号 S 432.4⁺4; S 435.654 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2015)05-0037-05

由核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)引起的油菜菌核病是世界性顽固病害, 也是中国油菜上最重要的病害, 在长江流域和西南地区, 菌核病对油菜生产已造成巨大经济损失^[1]。核盘菌菌核是越冬越夏和抵抗不良环境的子实体。在适宜的条件下菌核萌发产生子囊盘或菌丝, 构成初侵染来源, 故菌核萌发是很重要的环节^[2]。已有的研究表明, 温度、湿度、光照和菌核形成的营养基质等因子对菌核萌发和子囊盘的发育均有明显影响^[3], 低温下形成的菌核易萌发产生子囊盘, 而高温(25℃, 30℃)下形成的菌核则需要经过低温(4℃, 10℃)处理一段时间才能萌发形成子囊盘^[4-6]。在自然条件下, 油菜菌核病菌在田间形成的菌核, 于春季(3-4月份)温度适宜条件下, 萌发产生子囊盘^[7]。在人工诱导条件下, 一年中菌核可以在春季和秋季萌发^[8], 但目前国内对核盘菌菌核在秋季子囊盘萌发的现象还没有系统研究。

2011年10月, 笔者在湖北省咸宁市发现1枚核盘菌子囊盘, 从中获得9个单子囊孢子分离物, 将其称为秋季萌发菌株(autumn isolates)。2012年3月, 在湖北省咸宁市同一油菜田又采集到1枚子囊盘, 从中分离到9个单子囊孢子分离物, 将其称为春季萌发菌株(spring isolates)。本试验观察了核盘菌秋季萌发菌株和春季萌发菌株的生物学特性及

菌核萌发特性, 旨在为科学防治油菜菌核病提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

供试的18个核盘菌菌株均采自湖北省咸宁市, 其中9个秋季萌发菌株源于2011年10月份采集的1枚子囊盘(油菜地田埂), 编号为aSs-1至aSs-9。另外9个春季萌发菌株源于2012年3月份在咸宁市同一块油菜田采集的1枚子囊盘, 编号为sSs-1至sSs-9。

1.2 菌株培养性状观察

将9个秋季萌发菌株和9个春季萌发菌株分别接种于马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)上培养2d(20℃), 于菌落边缘打取菌丝块(直径5mm)接种到PDA平板(直径90mm)中央(每平板含20mL培养基), 每平板1个菌饼, 每处理10次重复(即10个平板), 在20℃和黑暗条件下培养24h和48h。采用十字交叉法测量各平板上的菌落直径, 菌丝生长速率(mm/d) = (48h菌落直径 - 24h菌落直径) / 2, 培养15d后, 观察各培养皿中的菌落特征, 记录各平板菌核数量及大小。测定菌核大小时, 每个菌株随机选取50粒成熟菌核, 测定各菌核长度和宽度。

收稿日期: 2014-10-15

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201103016)

余秋玉, 硕士研究生, 研究方向: 植物病原真菌分子生物学. E-mail: 790126670@qq.com

通信作者: 张静, 博士, 讲师, 研究方向: 植物病原真菌. E-mail: zhangjing1007@mail.hzau.edu.cn

1.3 菌株致病力测定

将嫩绿的油菜 (*Brassica napus* cv. *zhongshuang* No.9) 叶片用蒸馏水洗净, 放置于铺有湿润吸水纸的搪瓷盘中, 用打孔器在已活化的各菌株菌落边缘打取直径为 5 mm 的菌饼, 分别接种到油菜叶片上, 每个菌株接种 10 个叶片, 每个叶片接种 2 个菌丝块, 用塑料膜覆盖瓷盘, 将接种盘置于 20 °C 下培养。48 h 后观察发病情况, 用十字交叉法测量病斑直径。

1.4 菌株生物学特性观察

1) 菌丝生长速率及菌核产量。分别将接菌培养皿置于 4、10、15、20、25、30 °C 的恒温培养箱内黑暗培养。每个处理 10 次重复。测定菌丝生长速率及菌核产量的方法同上。

2) 室内培养及诱导菌核萌发。处理 1: 将菌株 aSs-3 和 sSs-1 的菌丝块接种到高温灭菌的胡萝卜块 (CA) 上, 分别于 4、10、15、20、25、30 °C 的培养箱中黑暗培养 2 个月, 收获菌核。将菌核放在培养皿中灭菌的河沙上, 于 20 °C 的培养箱内光照培养, 每皿 10 粒菌核, 每处理 5 次重复。处理 2: 将处理 1 中于 20 °C 下获得的菌核, 分别置于 4、10、15、20、25、30 °C 的培养箱内光照培养诱导菌核萌发, 每皿 10 粒菌核, 每个处理 10 次重复。定期加水, 保持培养皿内湿度一致, 湿度为河沙全部湿润, 又倒不出水滴为宜。观察菌核萌发情况。菌核产生子囊盘柄即表示菌核萌发。菌核萌发率 = (萌发菌核数/每处理总菌核数) × 100%。

3) 田间菌核萌发试验。第一年田间试验于 2012 年 10 月至 2013 年 5 月进行。将菌株 aSs-3 于 4、10、15、20、25、30 °C 和菌株 sSs-1 于 20 °C 下 CA 上培养 2 个月收获的菌核, 10 月份埋入田中装有土壤的盆钵中。并在田块和盆钵中播种油菜。每盆先装粗土约至盆口, 盖 1 层纱窗网, 上面摆上菌核, 每盆放 50 个菌核, 上面再覆盖 4~5 cm 厚的细土, 每个处理 4 次重复。记录子囊盘产生数目。

第二年田间试验于 2013 年 10 月至 2014 年 5 月进行。将菌株 aSs-3 和 sSs-1 于 15、20、25、30 °C 下 CA 上培养 1 个月的菌核, 10 月份埋入播种油菜的田中。每盆放 30 个菌核, 每个处理 3 次重复。埋入和调查方法同上。

1.5 数据分析

试验数据经 SAS 9.0 软件处理, 并采用邓肯氏新复极差多重比较法进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 两类核盘菌菌株的生物学特性比较

测定结果表明: 9 个秋季萌发菌株生长速率范围为 16.0~22.5 mm/d, 平均生长速率为 19.8 mm/d; 9 个春季萌发菌株生长速率范围为 17.7~20.4 mm/d, 平均生长速率为 19.6 mm/d。两类菌株菌丝 3 d 可长满培养皿 (直径为 9 mm), 7 d 于皿的边缘开始产生白色原基, 后慢慢变成浅黄色, 再变成深棕色, 最后变成黑色, 20 d 左右菌核成熟, 成熟菌核干燥坚硬, 形状不规则, 鼠粪状。两类菌株的菌核均分布在培养皿的边缘, 平均产量分别为每皿 27 个和 26 个, 大小分别为 (4.0~4.5) mm × (3.1~4.3) mm 和 (4.0~4.8) mm × (3.0~4.2) mm。方差分析结果显示, 两类菌株在菌落形态、菌丝生长速率、菌核形成时间、菌核的数量和大小均无显著差异 (表 1)。

表 1 菌株的生长速率、菌核产量和大小 (20 °C)¹⁾

Table 1 Mycelial growth rate, yield and size of sclerotia produced (20 °C)

菌株 Isolates	生长速率/(mm/d) Growth rate	每皿菌核数量/个 Sclerotia per dish	菌核大小/mm Sclerotial size
秋季萌发菌株 Autumn isolates			
aSs-1	16.0±3.0 f	26±4 be	4.0×3.2
aSs-2	20.1±3.3 bc	25±5 df	4.3×3.3
aSs-3	22.5±0.7 a	27±2 ae	4.2×3.1
aSs-4	20.8±1.8 ab	30±2 ab	4.1×4.2
aSs-5	20.4±2.0 ac	28±2 ad	4.0×3.3
aSs-6	21.1±1.4 ab	30±2 a	4.0×3.3
aSs-7	21.0±2.2 ab	24±5 ef	4.0×3.7
aSs-8	19.1±1.2 be	27±4 ae	4.4×4.3
aSs-9	17.4±2.7 ef	26±4 cf	4.5×3.1
春季萌发菌株 Spring isolates			
sSs-1	20.4±0.9 ac	25±5 df	4.1×3.5
sSs-2	20.4±1.2 ac	30±3 ac	4.0×3.3
sSs-3	18.3±1.5 ce	27±3 ae	4.6×4.0
sSs-4	19.6±2.8 bd	28±4 ae	4.6×4.1
sSs-5	20.1±0.9 bc	26±2 cf	4.8×4.2
sSs-6	19.8±1.2 bd	22±2 f	4.1×3.0
sSs-7	17.7±1.1 df	24±2 ef	4.0×3.5
sSs-8	20.4±0.6 ac	27±2 ae	4.0×3.2
sSs-9	19.5±1.6 be	26±4 cf	4.1×3.2

1) 同列数值后相同字母表示在 5% 水平上差异不显著 ($P > 0.05$)。The data within the same letters in the same column are not significantly different at the level of 5% ($P > 0.05$).

2.2 温度对菌丝生长及菌核产量的影响

测定结果表明: 菌株 aSs-3 和 sSs-1 菌丝最适生长温度均为 20 °C, 当培养温度低于 20 °C 时, 随培养温度升高, 菌丝生长速率加快; 当培养温度高于 20 °C, 低于 30 °C 时, 随培养温度升高, 菌丝生长速率缓慢或者停止。在 4、10、15、20、25、30 °C 培养条

件下,菌株 aSs-3 每皿形成的菌核数量分别为 0、7、12、23、37、33 个,菌株 sSs-1 每皿形成的菌核数量为 0、14、15、26、34、31 个。培养温度高(20、25、30 °C),菌核成熟需时间越短,15 d 左右菌核即成熟;培养温度低(4、10、15 °C),菌核成熟所需时间越长。方差分析结果显示,两类菌株对同一温度的适应性无显著差异($P>0.05$)(图 1)。

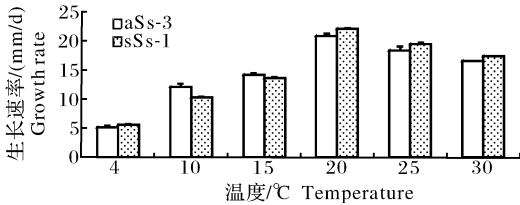
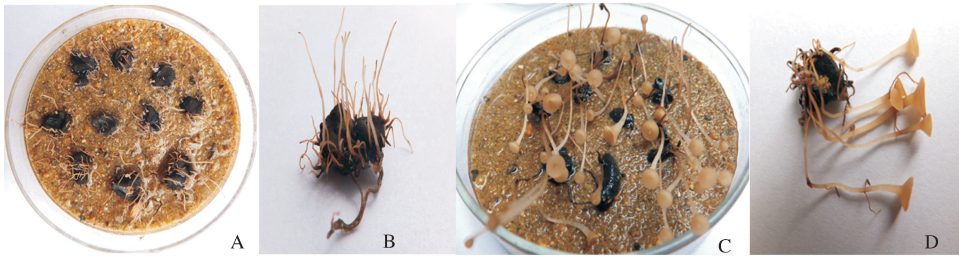


图 1 菌株 aSs-3 和 sSs-1 在不同温度下的菌丝生长速率
Fig.1 Hyphal growth rate of isolates aSs-3 and sSs-1 at different temperatures



A, B: 20 °C 下形成的菌核于 15 °C 下诱导萌发子囊盘柄 Sclerotia formed at 20 °C while induced at 15 °C germinated stipes;
C, D: 30 °C 下形成的菌核于 20 °C 下诱导萌发子囊盘 Sclerotia formed at 30 °C while induced at 20 °C germinated apothecia.

图 2 室内沙皿试验诱导菌核萌发子囊盘柄和子囊盘(aSs-3)

Fig.2 Induction of sclerotia germination stipes and apothecia test indoors (aSs-3)

2) 诱导温度与菌核萌发。将供试核盘菌菌株 aSs-3 和 sSs-1 在 20 °C 下形成的菌核分别置于 4、10、15、20、25、30 °C 下诱导,观察菌核萌发情况。观察结果表明:菌株 aSs-3 的菌核诱导 6 周后,可在 4、10、15、20 °C 下萌发,诱导 19 周后其萌发率分别为 53%、77%、100%、83%,每皿菌核产生子囊盘柄数量最多可达 17、39、340、29 个;子囊盘柄只在 20 °C 下发育成子囊盘,每皿(10 粒菌核)多达 28 枚子囊盘;在 25 °C 和 30 °C 的诱导温度下,菌核均未萌发。

供试菌株 sSs-1 的菌核诱导 7 周后,可在 4、10、15 °C 条件下萌发,诱导第 19 周后其萌发率分别为 35%、55%、35%,菌核萌发仅产生子囊盘柄,每粒菌核产生子囊盘柄数量最多可达 19、28、31 个;在 20、25、30 °C 的诱导温度下,菌核均未萌发(表 2)。

2.3 两类核盘菌菌株的致病力比较

测定结果表明:9 个秋季萌发菌株(aSs-1 至 aSs-9)和 9 个春季萌发菌株(sSs-1 至 sSs-9)均能对离体的幼嫩油菜叶片致病,病斑呈黄褐色,周围有黄色的晕圈,48 h 后对油菜的病斑直径分别达 27.0~31.7 mm(平均值 28.8 mm)和 26.7~32.0 mm(平均值 29.0 mm)。方差分析结果显示,两类菌株对油菜的致病力无显著差异($P>0.05$)。

2.4 温度对菌核形成和萌发的影响

1) 菌核形成温度与菌核萌发。测定结果表明:诱导 6 周后,菌株 aSs-3 在 20、25、30 °C 下形成的菌核即可萌发且形成子囊盘(图 2);诱导 13 周后,萌发率分别为 58%、85%、63%,但在 4、10、15 °C 下形成的菌核未萌发。对照的春季菌株 sSs-1 在不同温度下形成的菌核,在诱导 1~13 周后未萌发。

表 2 菌核形成的子囊盘柄和子囊盘数量

Table 2 Number of stipes and apothecia produced by different isolates

菌株 Isolate	菌核形成 温度/°C Sclerotia- forming temperature	诱导萌发 温度/°C Germination- inducing temperature	每皿子囊盘 柄数量/个 Stipes number per dish	每皿子囊盘 数量/枚 Apothecia number per dish	
aSs-3	4	20	0	0	
	10	20	0	0	
	15	20	0	0	
	20	20	12~33 (24)	1~17 (9)	
	25	20	18~47 (33)	1~22 (10)	
	30	20	6~39 (14)	2~28 (9)	
sSs-1	20	20	0	0	
	aSs-3	20	4	6~17 (9)	0
		20	10	14~39 (22)	0
		20	15	193~340 (251)	0
		20	20	11~29 (17)	0~15 (4)
		20	25	0	0
20		30	0	0	
sSs-1	20	4	7~19 (10)	0	
	20	10	11~28 (16)	0	
	20	15	16~31 (24)	0	
	20	20	0	0	
	20	25	0	0	
	20	30	0	0	

2.5 田间菌核的萌发

在田间试验中,菌株 aSs-3 的菌核在处理 4 个月(春季 2 月)后萌发,高温(20、25、30 °C)下形成的菌核萌发子囊盘数较多,处理 6 个月(2013-03-24)后每盆平均产子囊盘数量分别为 83 枚、173 枚和 129 枚。萌发的旺盛期集中在 3 月的中下旬。在后期(2013-04-01),低温(4、10、15 °C)下形成的菌核也有萌发,但是萌发子囊盘数量少,每盆平均产子囊盘数量分别为 1 枚、3 枚和 3 枚(图 3-A)。由此可见,菌核的形成温度对菌核的萌发有一定的影响。而菌株 sSs-1 形成的菌核(20 °C 下培养获得),在田间调查期间菌核未萌发形成子囊盘。

在 2013 年 10 月至 2014 年 5 月的田间试验中,菌株 aSs-3 和菌株 sSs-1 形成的菌核在处理 5 个月(春季 3—4 月)后萌发,在调查过程中,两类菌株在 30、25、20 °C 下形成的菌核萌发,而在 15 °C 下形成的菌核未萌发,在 30 °C 下形成的菌核萌发子囊盘数目最多,其次是 25 °C 下形成的菌核,在 20 °C 下形成的菌核萌发子囊盘数量都较少。其中菌株 sSs-1 在 30 °C 下形成的菌核萌发子囊盘数量比菌株 aSs-3 萌发的子囊盘多,而菌株 aSs-3 在 25 °C 下形成的菌核萌发子囊盘数量比菌株 sSs-1 多(图 3-B, C)。

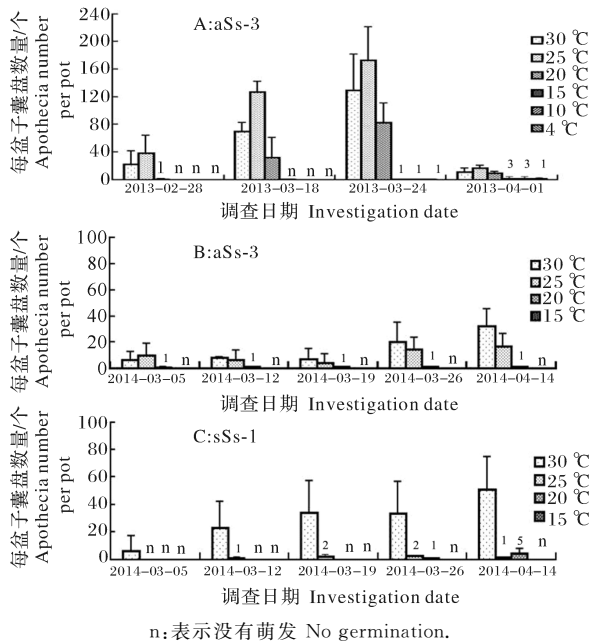


图 3 不同温度下形成的菌核和在田间萌发产生的子囊盘

3 讨论

核盘菌菌株间菌核的萌发存在明显的多样性,不同地域、不同寄主来源的菌核萌发特性不同^[9]。地域对核盘菌菌核萌发多样性的影响主要表现为影响群体中不同萌发型菌株的构成。寄主对核盘菌菌核萌发的影响有两个方面,即地域不同和寄主的感病期不同对病菌群体的选择。本试验所用的两类菌株均采集于湖北咸宁油菜,由此避免了地域和寄主对菌核萌发造成的影响。采自秋季菌株的菌核在秋季(10 月份)萌发产生子囊盘,这个现象在湖北省为首次发现。将 20、25、30 °C 下形成的菌核,在 20 °C 室内诱导,萌发时间比在 4、10、15 °C 下形成的菌核萌发时间早、萌发率高,说明菌核形成温度高有利于菌核的萌发,且菌核的萌发不需要低温诱导处理也可以形成子囊盘。这与 Huang 等^[6]的研究结果有差异,即在 25 °C 和 30 °C 下形成的菌核需经 10 °C 低温处理一段时间才能萌发形成子囊盘。

本试验选择 20 °C 左右作为诱导温度,是基于在 PDA 上 20 °C 下培养产生的菌核,45 d 左右直接在培养皿里萌发产生子囊柄。将 20 °C 下形成的菌核置于 4、10、15、20、25、30 °C 下诱导,秋季代表菌株 aSs-3 在 4、10、15、20 °C 下可诱导菌核萌发,春季代表菌株 sSs-1 只能在 4、10、15 °C 下诱导菌核萌发,说明菌核适宜在低温(≤ 20 °C)下萌发,但是在低温下不易形成子囊盘。

2 年的田间试验表明,高温下形成的菌核利于萌发形成子囊盘,这与李国庆等^[9]的研究结果一致,即在室内条件下高温形成的菌核更易萌发。另外,2 年的田间试验结果略有差异。2012 年至 2013 年的田间试验结果表明:秋季代表菌株 aSs-3 在高温下形成的菌核易于萌发,且 25 °C 下形成的菌核萌发子囊盘数目最多;春季代表菌株 sSs-1 在 20 °C 下形成的菌核未萌发。2013 年至 2014 年的田间试验结果表明:秋季代表菌株 aSs-3 和春季代表菌株 sSs-1 在 30、25、20 °C 下形成的菌核易萌发,在 30 °C 下形成的菌核萌发子囊盘数目最多,其次是 25 °C 下形成的菌核。这些差异可能与田间环境、气象因素、生物因子等有关^[10-12]。目前,尚未见在长江中下游地区发现秋季田间菌核萌发的报道,但本试验仅观察了温度对核盘菌菌核萌发的影响,其他条件下菌核的萌发特性还需进一步研究。

Fig.3 Number of apothecia produced by sclerotia of *S. sclerotiorum* formed at different temperatures under field conditions

参 考 文 献

- [1] 李明桃.油菜菌核病的研究[J].农业灾害研究,2012(4):4-7.
- [2] 罗宽.有关 *Sclerotinia sclerotiorum* 的研究[J].中国油料作物学报,1981(3):60-65.
- [3] 杨谦,张翼鹏.核盘菌子囊盘形成的影响因子[J].东北林业大学学报,1995,23:126-130.
- [4] KEAY M A. A study of certain species of the genus *Sclerotinia* [J]. Ann Appl Biol, 1939, 26: 227-246.
- [5] PURDY L H. *Sclerotinia sclerotiorum*: history, disease and symptomatology, host range, geographic distribution and impact [J]. Phytopathology, 1979, 69: 875-880.
- [6] HUANG H C, KOZUB G C. A simple method for production of apothecia from sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates of different geographic origin [J]. Bot Bull Acad Sin, 1991, 32: 279-286.
- [7] 李强生, MCCARTNEY H A, HERAN A, 等. 油菜菌核病菌病原菌侵染条件的研究[J]. 安徽农业科学, 2000, 28(3): 314-315.
- [8] 汪国森, 王崇仁, 吴友三. 核盘菌属 (*Sclerotinia*) 真菌有性世代的研究[J]. 沈阳农业大学学报, 1992, 23(4): 286-291.
- [9] 李国庆, 王道本, 周启, 等. 核盘菌菌核萌发多样性的研究[J]. 植物保护学报, 1997, 24(1): 59-64.
- [10] RUSSO G M, DAHLBER G, ETTEN J L V. Identification of a development-specific protein in sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* [J]. Exp Mycol, 1982, 6: 259-267.
- [11] 申翠翠. 核盘菌致病和菌核形成相关基因 SOP1 功能的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学图书馆, 2013.
- [12] XIAO X Q, XIE J T, CHENG J S, et al. Novel secretory protein Ss-Caf1 of the plant-pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* is required for host penetration and normal sclerotial development [J]. Molecular Plant-Microbe Interaction, 2014, 27: 40-55.

A comparison of the biological characteristics of autumn and spring-germination isolates of rape *Sclerotinia sclerotiorum*

YU Qiu-yu FAN Xuan ZHANG Jing LI Guo-qing
State Key Laboratory of Agricultural Microbiology,
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract Two types of rape *Sclerotinia sclerotiorum* isolates, the autumn-germination isolates (autumn isolates) and the spring-germination isolates (spring isolates), were isolated from a single field of oilseed rape in Xianning City of Hubei Province. Nine autumn isolates (aSs-1 to aSs-9) and nine spring isolates (sSs-1 to sSs-9) were compared to find out the growth and production of sclerotia on potato dextrose agar (20 °C) and the pathogenicity on the leaves of oilseed rape. The results showed that the two types of isolates had no significant differences ($P > 0.05$) in growth rate, number of sclerotia per dish, sclerotial size and lesion diameter on leaves of oilseed rape. Two representative isolates, aSs-3 and sSs-1, were further compared for sclerotial germination under different inducing temperature, the results showed that sclerotial forming and inducing temperature affect sclerotial germination in indoors and the field experiment, and it is more easily to germinate for sclerotia formed at high temperature condition than at low temperature condition. These results suggest that the autumn isolates and the spring isolates of *S. sclerotiorum* differed greatly in sclerotial germination behavior.

Key words rape; *Sclerotinia sclerotiorum*; strain; sclerotia

(责任编辑:陈红叶)