

## 抗黑胫病烤烟品种资源筛选的研究初报

黄成江<sup>1,2</sup>, 李天福<sup>1</sup>, 卢向阳<sup>2</sup>, 周冀衡<sup>3</sup>, 易克<sup>2</sup>

(1. 云南省烟草科学研究所, 云南 玉溪 653100; 2. 湖南农业大学生化与发酵工程实验室, 湖南 长沙 410128; 3. 湖南农业大学烟草工程技术中心, 湖南 长沙 410128)

**摘要:** 采用离体叶片法测定了分离自湖南主产烟区的6个烟草黑胫病菌菌株的致病性, 结果表明不同菌株间致病性存在明显差异, 病情指数在6.6~89.0之间, 其中以phy3菌株致病性最强。以phy3为接种菌株, 在病圃进行3种接种方法筛选, 结果以菌丝块创伤茎基部接种法发病率最高。综合以上试验结果, 采用phy3为接种菌株, 以菌丝块创伤茎基部方法接种, 在病圃测定了52个烤烟品种资源对黑胫病的抗病性, 结果表明不同烤烟品种资源抗性差异明显。其中, 高抗品种资源占15.39%, 中抗品种资源占15.39%, 中感品种资源占30.77%, 感病品种资源占38.46%, 尤其以PVH01抗性最强。

**关键词:** 烤烟; 黑胫病; 致病力; 抗性

**中图分类号:** S 572.02    **文献标识码:** A    **文章编号:** 1004-390X (2008) 04-0565-06

## Screening of Flue-cured Tobacco Varieties Resistance to Tobacco Black Shank

HUANG Cheng-jiang<sup>1,2</sup>, LI Tian-fu<sup>1</sup>, LU Xiang-yang<sup>2</sup>, ZHOU Ji-heng<sup>3</sup>, YI Ke<sup>2</sup>

(1. Yunnan Tobacco Science Research Institute, Yuxi 653100, China;

2. Laboratory of Biochemistry and Fermentation Engineering, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

3. Technology Center of Tobacco Engineering, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

**Abstract:** The pathogenicities of 6 strains of *Phytophthora nicotianae* var. *nicotianae* (Breda de Haan) Tucker collected from Hunan province in China were tested by detached-leaves method in vitro. There was significant difference among the pathogenicities of the 6 strains, and the disease index ranged from 6.6 to 89.0, of which the pathogenicity of phy3 was the strongest. The seedling wound stems inoculated by mycelium piece was the best inoculation method by screening 3 inoculation methods in disease garden. By using the strain of phy3 for inoculation method and the seedling stems inoculated by mycelium for inoculation method, 52 varieties of flue-cured tobacco against black shank in disease garden were screened. It was showed that the disease resistances of different varieties were obviously different, and that of PVH01 was the strongest of the 52 tested varieties.

**Key words:** flue-cured tobacco; black shank; pathogenicity; disease resistance

烟草黑胫病 [ (*Phytophthora nicotianae* var. *nicotianae* (Breda de Haan) Tucker) ] 是烟草主要的毁灭性病害之一, 目前由于我国连作烟田面积不断扩大, 连作年限不断增长, 加重该病害的流行。当前生产上一般采用化学防治、栽培技术等综合

防治措施控制该病害。虽然取得了一定防治效果, 但同时也带来了不少问题。在烟草及烟草制品逐渐向无公害方向发展的今天, 抗病育种因具有多抗、高抗和安全等优点, 而成为了烟草病害防治的经济环保且最有效的措施<sup>[1]</sup>。为此, 选育出适

收稿日期: 2007-03-23

修回日期: 2007-08-29

作者简介: 黄成江 (1980-), 男, 湖南人, 助理研究员, 主要从事烟草生理生化研究。E-mail: chjhuang@yntsti.com

合当地生长的优质抗病烤烟新品种已成为生产上的急需。本试验在病圃中,进行了对 52 个烤烟品种资源抗黑胫病的鉴定,旨在为烤烟品种的抗病育种和合理布局提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 供试菌株

本试验所用 6 株烟草黑胫病菌株 (*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*) 均为 0 号生理小种,由湖南农业大学生物安全科技学院罗宽教授提供。

#### 1.1.2 供试寄主植物

供试烤烟品种的种子均由云南烟草科学研究所提供。种子温烫浸种催芽后,播在漂盘上,按照常规的漂盘育苗方法管理。待长到四叶一心时,移栽到直径为 15 cm × 15 cm 塑料营养钵内,营养钵用清水洗净,并与移栽土作消毒处理。每个营养钵种 1 株苗,并定期施肥。待其长到五叶一心时备用。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 烟草黑胫病菌致病力的测定

烟草黑胫病菌致病力的测定采用离体叶片法<sup>[2]</sup>。病情分级标准参照中华人民共和国烟草行业标准—烟草病害分级及调查方法 YC/T 39—1996。根据病情指数对烟草黑胫病菌进行致病力分级。

$$\text{病情指数} = \frac{\sum (\text{发病级别} \times \text{各级病叶数})}{\text{调查总叶数} \times \text{最高发病级别}} \times 100$$

#### 1.2.2 接种方法的筛选

菌丝块创伤茎基部接种:采用王革等人方法<sup>[2,3]</sup>。游动孢子悬浮液茎基部注射接种和菌丝体悬浮液茎基部注射接种:采用朱贤朝等人方法<sup>[4,5]</sup>。选取大小一致且健康(五叶一心)烟株,

以 phy3 为接种菌株,接种游动孢子浓度为  $1.0 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^4$  个孢子/mL,接种菌丝块为直径 5 mm 和菌丝体悬浮液浓度为  $1.0 \times 10^9 \sim 9.0 \times 10^9$  /mL。

#### 1.2.3 烟草品种对黑胫病抗性的鉴定

试验于 2004 年 5 月设在湖南农业大学病圃,共 52 个烤烟品种,每品种重复 3 次,每个处理 15 株。以 phy3 为接种菌株,采用菌丝块创伤茎基部接种方法接种,接种 3 d 后拆棉花,并于第 10 d 按照病情分级标准分级,并计算病情指数。烤烟抗性水平按以下标准分类:抗病,病情指数 25 以下;中抗,病情指数 26~50;中感,病情指数 51~75;感病,病情指数 75 以上。

#### 1.2.4 数据统计和分析

数据统计和分析均采用分析软件 SAS 6.0。

## 2 结果与分析

### 2.1 烟草黑胫病菌株的致病力

采用离体叶片法对湖南农业大学生物安全科技学院从湖南主产烟区分离、纯化 6 株烟草黑胫病菌株的致病力进行筛选。结果表明,它们的致病力从大到小为 phy3, phy6, phy1, phy4, phy2, phy5, 其病情指数在 6.6~89.0 范围,平均值为 46.62。从表 1 可以看出致病力最强的株系是 phy3, 它的致病力是 phy5 的 13.5 倍。经过数据处理和统计分析,得出各株系致病力存在极显著的差异性。这些结果与朱贤朝<sup>[6]</sup>、郑小波<sup>[7]</sup>的研究结果一致。这表明黑胫病菌致病性发生变异,从而导致了各地分离得到的菌株致病力存在极显著的差异性。为保证人工诱发接种成功率,本实验采用致病力最强的株系 phy3。

表 1 烟草黑胫病菌株致病力

Tab. 1 Pathogenicity of 6 strains of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*

菌株 strains	病情指数 disease index	病情级数 disease level	致病力 pathogenicity	差异显著性	
				significant difference test	
				SSR <sub>0.05</sub>	SSR <sub>0.01</sub>
phy3	89.0	3	高 high	a	A
phy6	71.2	2	中 medium	b	B
phy1	59.9	2	中 medium	c	C
phy4	40.1	2	中 medium	d	D
phy2	12.9	1	低 low	e	E
phy5	6.6	0	无 non	f	F

注:同一列中,不同的小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ),不同的大写字母表示差异极显著 ( $P < 0.01$ ),下同。

Note: In a column, different lowercases mean significant difference ( $P < 0.05$ ), different capitals mean extremely significant difference ( $P < 0.01$ ), the same as below.

2.2 不同接种方法的发病率

以 G80 和红花大金元两个烤烟品种为材料, 研究不同接种方法的发病率。从表 2 可以看出, 游动孢子悬浮液茎基部注射接种和菌丝体悬浮液茎基部注射接种的平均发病率分别为 70% 和 60%, 而菌丝块创伤茎基部接种平均发病率为 90%。结果表明: 用菌丝块接种发病率比较高, 以创伤接种发病率最高, 菌丝块发病率达 100% (品种为红花大金元), 非创伤接种发病率相对较低, 菌丝块发病率分别为 50% 和 70%; 游动孢子悬浮液 ( $1.0 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^4$  个孢子/mL) 接种发病率也仅为 60% 和 80%。综上所述, 烤烟抗黑胫病品种资源筛选的最佳接种方式为菌丝块创伤茎基部接种。这与王革等人<sup>[3]</sup>研究成果相似。这可能是菌丝块创伤茎基部接种时人为创伤茎突破表皮这道防线, 但在

抗病品种上, 菌丝的繁殖扩展在根的表皮受到限制。

表 2 不同接种方法的发病率 (phy3 为接种菌株)

Tab. 2 Pathogenicity of inoculation methods (phy3 as the inoculation strain)

接种方法 inoculation methods	烟草品种 tobacco varieties	
	G80	红花大金元 hongda
菌丝块创伤茎基部接种 Inoculation of seedling stems with mycelium	80%	100%
游动孢子悬浮液茎基部注射接种 Inoculation of seedling stems with zoospores of suspension	60%	80%
菌丝体悬浮液茎基部注射接种 Inoculation of seedling stems with mycelium of suspension	50%	70%

2.3 烤烟品种的抗病性

表 3 烤烟品种对黑胫病的抗病性

Tab. 3 Resistance of flue-cured tobacco varieties to tobacco black shank

烟草品种 varieties	平均发病率/% mean disease incidence	病情指数 disease index	抗性水平 resistance	差异显著性 significant difference test	
				SSR <sub>0.05</sub>	SSR <sub>0.01</sub>
9601	100.00	100.00	S	a	A
红花大金元 Hongda	100.00	98.44	S	a	A
920032	100.00	97.73	S	b	B
翠碧一号 Cuibi - 1	100.00	97.50	S	c	C
YZ9404	100.00	97.50	S	c	C
K346	100.00	94.44	S	d	D
9823	100.00	91.67	S	e	E
CV90 - 7	100.00	90.00	S	f	F
CF965	100.00	90.00	S	f	F
GI939	100.00	90.00	S	f	F
94 - 11 - 2	100.00	87.50	S	g	G
云烟 85 Yunyan 85	100.00	85.00	S	h	H
V2	90.00	85.00	S	h	H
9201	100.00	82.50	S	i	I
G70	100.00	80.00	S	j	J
NC82	88.89	77.78	S	k	K
PVH06	100.00	77.50	S	l	L
89 - 40	100.00	77.50	S	l	L
951904	90.00	77.50	S	l	L
9107	80.00	77.50	S	l	L
云烟 87 Yunyan 87	100.00	75.00	MS	m	M

续表

烟草品种 varieties	平均发病率/% mean disease incidence	病情指数 disease index	抗性水平 resistance	差异显著性 significant difference test	
				SSR <sub>0.05</sub>	SSR <sub>0.01</sub>
				湘烟一号 Xiangyan - 1	100.00
6388	100.00	72.50	MS	n	N
CT108	80.00	72.50	MS	n	N
NC567	77.78	72.22	MS	o	O
PYH02	100.00	70.00	MS	p	P
9402	100.00	70.00	MS	p	P
D4 - 5 - 1 - 1	90.00	67.50	MS	q	Q
98 - 3	90.00	67.50	MS	q	Q
中烟 86 ZHongyan 86	80.00	67.50	MS	q	Q
315	100.00	63.89	MS	r	R
CT106	88.89	61.11	MS	s	S
中烟 90 ZHongyan 90	88.89	61.11	MS	s	S
中烟 14 ZHongyan 14	70.00	60.00	MS	t	T
9417	70.00	57.50	MS	u	U
NB2	80.00	52.50	MS	v	V
K326	80.00	50.00	MR	w	W
951909	80.00	50.00	MR	w	W
CT862	70.00	50.00	MR	w	W
4464	70.00	40.00	MR	x	X
9608	50.00	35.00	MR	y	Y
品 4 Pin 4	50.00	35.00	MR	y	Y
吉永一号 Jiyong - 1	50.00	32.50	MR	z	Z
D6 - 8 - 2 - 2	80.00	30.00	MR	a	A
317	50.00	25.00	R	b	B
RG11	40.00	25.00	R	b	B
84E101	40.00	25.00	R	b	B
9307	20.00	20.00	R	c	C
311	40.00	17.50	R	d	D
K596	22.22	17.50	R	d	D
9403	33.33	16.67	R	e	E
PVH01	0.00	0.00	R	f	F

注：R 为抗病，病情指数 25 以下；MR 为中抗，病情指数 26 ~ 50；MS 为中感，病情指数 51 ~ 75；S 为感病，病情指数 75 以上。

Note R; resistant (Disease index 0 ~ 25), MR; moderate resistant (Disease index 26 ~ 50), MS; moderate susceptible (Disease index 51 ~ 75), S; susceptible (Disease index 75 ~ 100).

病圃的抗病性鉴定试验结果（表 2, 3）表明：在目前所收集的 52 个烤烟品种当中，高抗品种有 PVH01, 9307, 云烟 311, RG11, K596, 云烟 317, 84E101, 9403, 占供试烤烟品种总数的

15.39%；中抗品种有 CT862, 吉永一号, 品 4, 951909, D6 - 8 - 2 - 2, K326, 4464, 9608, 占供试烤烟品种总数的 15.39%；中感品种有云烟 87, 湘烟一号, 6388, CT108, NC567, PYH02, 9402,

D4-5-1-1, 98-3, 中烟86, 315, CT106, 中烟90, 中烟14, 占供试烤烟品种总数的30.77%; 感病品种有9601, 红花大金元, 920032, 翠碧一号, YZ9404, K346, 9823, CV90-7, CF965, GI939, 94-11-2, 云烟85, V2, 9201, G70, NC82, PVH06, 89-40, 951904, 9107共20个, 占38.46%。经过数据处理和统计分析的结果表明(见表2, 3), 在病圃中, 不同的烟草品种对烟草黑胫病的抗病性有极显著性的差异。但这些烟草品种对烟草黑胫病的抗病性尚需要进一步田间鉴定。这表明抗病性是由品种自身遗传因素所决定的, 但品种抗病性也与环境有关。

### 3 讨论

本试验采用离体叶片法对6株来自湖南不同地区和寄主来源的烟草黑胫病菌菌株, 进行了致病力筛选, 其病情指数在6.6~89.0之间, 这说明了烟草黑胫病菌致病力存在显著性差异。这些可能是在长期进化中, 寄主和病原物由于多种变异和相互选择, 寄主产生了专化抗性, 而病原菌致病性则向着克服这种抗性的方向变异, 产生专化致病性的基因, 导致致病性的不断分化所造成的。在培育和使用抗病品种时, 首先要考虑的最重要问题之一就是烟草黑胫病菌致病性发生变异的可能性。可能因高毒力菌系或新生理小种的出现而使一些抗病品种丧失对该病的抗性<sup>[8]</sup>。在利用寄主抗性作为防治措施时, 应考虑病原菌致病性发生变异的潜力大小。很多抗病品种伴随着高毒力菌株或新生理小种的出现而最终成为感病品种<sup>[9]</sup>。为此, 病原菌致病性的分化应当引起育种工作者的足够重视。

不同接种方法的选择是根据病原菌的侵染特性来确定的。烟草黑胫病菌主要是通过游动孢子囊、游动孢子和菌丝体来侵染烟草茎基部和根部, 叶部也可侵染。国内外已报道了多种接种方法以及它们之间的比较。本试验结果表明菌丝块创伤茎基部接种发病率最高。这可能是菌丝块创伤茎基部接种时人为创伤茎突破表皮这道防线, 但在抗病品种上, 菌丝的繁殖扩展在根的表皮受到限制。同时也进一步说明了寄主植物的不同部位对病原菌的反应差异很大<sup>[13]</sup>, 茎的抗性与其不同层次的组织有明显的差异, 茎的表皮具有一定的抗病性, 而皮层是感病的, 髓部不适于黑胫病菌的

生长繁殖<sup>[14]</sup>。

品种抗病性是决定品种能否在生产上大面积推广应用的一个重要因素, 也是综合防治病害的经济、有效措施, 同时还有利于提高烟叶安全性, 符合无公害烟叶发展的趋势。试验结果表明全国推广品种V2, NC82, 中烟14在温室鉴定时为高感, 而在田间鉴定时为高抗、高抗和中抗<sup>[15]</sup>。生态环境的差异与品种抗性差异是造成病原菌生理小种不同的客观条件, 导致运用不同生态环境中分离到各致病生理小种来做抗性鉴定时结果存在偏差。且本试验采用的是菌丝体创伤茎基部接种方法, 由于损伤了茎表皮, 品种的抗病性就可能受到影响。前人的研究表明: 品种抗病性与品质常常是相互矛盾的。比如品质较好的品种K326, K346, RG11, 红花大金元等, 但它们易感烟草花叶病毒病。

应用本文筛选出抗黑胫病品种资源, 在生产上, 可以在一些黑胫病发病率较高的地块选择这些抗病品种, 如RG11; 而在一些发病率较低的地块则可选择一些品质较好而抗性较差品种, 如云烟87。在育种上, 也可以将较好抗黑胫病品种与其它品质较好而抗性较差品种杂交或通过遗传改良等措施, 获得品质较好而抗性较强的品种。实践证明, 选用抗病品种是综合防治病害的一项重要而经济有效的措施。这也表明筛选现有的一些烤烟抗黑胫病品种资源是育种工作者的重要的基础性研究。

### [参考文献]

- [1] DAVIS DL, NIELSEN MT. Tobacco production, chemistry and technology [M]. Oxford: Blackwell Science, 1999.
- [2] 王革, 郑小波, 陆家云, 等. 云南省烟草黑胫病菌致病力分化的研究 [J]. 南京农业大学学报, 1997, 20(4): 30-35
- [3] DASGUPTA F, GAREGG F. Alkyl sulfonyl triflate as activator in the thioglycoside-mediated formation of  $\beta$ -glycosidic linkages during oligosaccharide syntheses [J]. Carbohydrate Research, 1988, 177: c13.
- [4] 朱贤朝, 郭振业, 刘宝安. 在山东省烟草黑胫病菌 (*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*) 中出现0和1号小种的分化 [J]. 中国烟草, 1986, (2): 8-10.
- [5] 朱贤朝, 郭振业, 刘宝安. 我国烟草黑胫病菌生理小种研究初报 [J]. 中国烟草, 1987, (4): 1-3.
- [6] 朱贤朝. 烟草黑胫病菌生理小种研究概况和鉴定技

- 术 [J]. 中国烟草, 1982, (1): 23 - 26.
- [7] 郑小波. 疫霉菌及其研究技术 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1997.
- [8] 朱贤朝, 郭振业, 刘宝安. 我国烟草黑胫病菌生理小种研究初报 [J]. 中国烟草, 1984, (1): 4 - 7.
- [9] 李振歧. 植物免疫学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1995.
- [10] WILLS WH, MOORE LD. Response of some cultivars and lines of tobacco to stem inoculation with *Phytophthora parasitica* var. *nicotmnae* [J]. Tobacco Science, 1977, 21: 51 - 53.
- [11] MCLNTYRE JL, HANKIN L. Lack of kestose production by race 3 of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* differentiates it from race 0 and 1 [J]. Mycol, 1977, 69: 756 - 760.
- [12] YONGMIN ZHANG, DAUSSE B, SINAY P, et al. . Synthesis and NMR study of a heptasaccharide, epitope of the stage specific embryonic antigen 1 (SSEA) [J]. Carbohydrate Research, 2000, 324: 231 - 234.
- [13] 谢成颂, 王智发, 刘延荣. 国内外烟草黑胫病菌生理小种鉴定评价 [J]. 中国烟草, 1987, (1): 12 - 16.
- [14] WILLS WH. A comparison of black shank resistance of tobacco measured in inoculated whole plants and excised leaf tissue [J]. Tobacco Science, 1971, 15: 47 - 50.
- [15] 雷永和, 许美玲, 黄学跃. 云南烟草品种志 [M]. 昆明: 云南省科学技术出版社, 1999.



(上接第 557 页)

- [47] FRIEDMAN M, GUMBMANN M R. The utilization and safety of isomeric sulfur-containing amino acids in mice [J]. J Nutr, 1984, 114: 2301 - 2310.
- [48] ABE H, YOSHIKAWA N, SAROWER M G, et al. . Physiological function and metabolism of free D-alanine in aquatic animals [J]. Biol Pharmaceut Bull, 2005, 28 (9): 1571 - 1577.
- [49] SVEIER H, NORDAS H, BERGE G E, et al. . Dietary inclusion of crystalline D- and L-methionone: effects on growth, feed and protein utilization, and digestibility in small and large Atlantic salmon (*Salmon salar* L.) [J]. Aquac Nutrition, 2001, 7: 169 - 181.
- [50] KIM K, KAYES T B, AMUNDSON C H. Requirements for sulfur amino acids and utilization of D-methionine by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Aquaculture, 1992, 101: 95 - 103.
- [51] BRANCHET P, ALVARADO F, PUIGSERVER A. Kinetic evidence for separate systems in transport of D- and L-methionine by rat small intestine [J]. Am J Physiol, 1987, 252: 320 - 324.
- [52] ZHENG L, CHEN J, ZHU Y, et al. . Comparison of the transport characteristics of D- and L-methionine in a human intestine epithelia model (Caco-2) and in a perfused rat intestinal model [J]. Pharmac Res, 1994, 11: 1771 - 1776.
- [53] WALTON M J, WILSON R P. Postprandial changes in plasma and liver free amino acids of rainbow trout fed complete diets containing casein [J]. Aquaculture, 1986, 51: 105 - 115.