

烟草黑胫病菌 0 号生理小种不同条件下培养特性的研究

苏振刚^{1,2}, 王 静¹, 周 佳^{1,2}, 李锡坤^{1,2}, 郑林林^{1,2}, 李元元^{1,2},
赵百英^{1,2}, 杨 帆^{1,2}, 王元英^{1*}

(1. 中国农业科学院烟草研究所, 青岛 266101; 2. 中国农业科学院研究生院, 北京 100081)

摘 要: 研究了烟草黑胫病菌 0 号生理小种的若干培养性状, 为进一步展开与之相关的研究和综合防治提供理论基础。用培养基、光照、菌龄、诱导剂和诱导时间等不同因素研究了对烟草黑胫病菌 0 号生理小种的生长速度、产孢量和游动孢子释放量等方面的影响。结果表明, 燕麦培养基较适于其生长和产生孢子囊, 光照限制其生长; 在本实验周期内, 培养 21 d 的菌丝较适宜诱导, 0.1% KNO₃ 溶液浸泡菌丝有助于孢子囊的产生; 经 26 °C 培养 72 h 后, 突降 12 °C 处理 0.5 h, 结合 1% 葡萄糖溶液可促使孢子囊释放游动孢子, 并延长后者的活动时间。

关键词: 烟草; 黑胫病菌; 培养特性

中图分类号: S435.72

文章编号: 1007-5119 (2011) 01-0056-05

DOI: 10.3969/j.issn.1007-5119.2011.01.013

Different Conditions on the Cultural Characteristics of Race 0 of *Phytophthora Parasitica* var. *nicotianae*

SU Zhengang^{1,2}, WANG Jing¹, ZHOU Jia^{1,2}, LI Xikun^{1,2}, ZHENG Lili^{1,2}, LI Yuanyuan^{1,2}, ZHAO Baiying^{1,2},
YANG Fan^{1,2}, WANG Yuanying^{1*}

(1. Tobacco Research Institute of CAAS, Qingdao 266101, China; 2. Graduate School of CAAS, Beijing 100081, China)

Abstract: The cultural characteristics of race 0 of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* were investigated in order to provide more basic information for further study and integrated management of the disease. The study used several cultural factors, including experimental medium, light, bacteria age, inducing agents and induction time to observe cultural characteristics of race 0 of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*, such as growth rate of tobacco, sporangium production and tour dynamic spores release etc. The results showed that Oatmeal medium was suitable for mycelium growth and production of sporangium; light could limit its growth; based on the experimental period and other factors, mycelium cultivated for 21 days is more appropriate for induced; 0.1% KNO₃ solution soaking mycelium contribute to sporangium production; after 72 h cultivation by 26 °C, sudden drop of 12 °C for 0.5 h, combine with 1% glucose solution can promote sporangia to release zoospores, and it can also prolong time of zoospore's activities.

Keywords: tobacco; *phytophthora parasitica*; culture characteristics

烟草黑胫病是烟草上的重要病害之一, 1934 年在山东鉴定出烟草黑胫病^[1]; 其病菌平均发病率为 5% ~ 12%, 严重田块发病率高达 75%, 甚至造成绝收。在自然条件下寄主范围有所扩大, 亦可侵染辣椒、黄瓜和番茄等重要经济作物, 破坏性极强^[2], 可造成较大的社会经济损失。染病后整个植株枯萎凋亡, 特别是阴雨天易造成病菌的大面积传播。本研究探索烟草黑胫病菌 0 号生理小种病原菌的生物

学特性和病害发生机制, 以便更好地了解该病菌的生长规律和产孢特点, 为从植物保护、抗病育种和栽培等方面来控制病害发生, 进一步开展与之相关的研究和综合防治提供参考。

1 材料和方法

1.1 供试材料

1.1.1 菌株 烟草黑胫病菌 0 号生理小种由中国农

基金项目: 国家烟草专卖局项目“优质抗病烟草新品种选育”(110200601008)

作者简介: 苏振刚, 男, 在读硕士, 主要从事烟草抗病育种研究。E-mail: szhg521@163.com。*通信作者, E-mail: wyytob@126.com

收稿日期: 2010-03-21

业科学院烟草研究所植物保护研究室提供。

1.1.2 培养基 燕麦培养基(OA): 燕麦片 30 g, 琼脂 18 g, 去离子水 1 000 mL; 马铃薯培养基(PDA): 马铃薯 200 g, 葡萄糖 15 g, 琼脂 18 g, 去离子水 1 000 mL; 玉米粉培养基(CMA): 玉米粉 200 g, 琼脂 17 g, 去离子水 1 000 mL; 番茄汁培养基(TJA): 番茄汁 50 mL, 牛肉膏 10 g, 乳糖 20 g, 酵母提取液 5 g, 琼脂 17 g, 蒸馏水 1 000 mL; 烟草汁培养基: 新鲜烟叶 200 g, 琼脂 20g, 蒸馏水 1 000 mL。

1.2 试验设计与方法

1.2.1 培养基和光照对菌丝生长影响的试验 将上述 5 种培养基经 121 °C 高压灭菌 20 min 后, 分别倒入无菌培养皿(直径 88 mm), 挑取生长良好的烟草黑胫病菌 0 号生理小种 0.5 cm² 大小的菌丝块转接到培养皿中央部位。将转接菌丝的培养皿平均分成两份, 分别倒置于光照和黑暗条件下 28 °C 恒温培养。从第 24 h 起, 每隔 1 d 测量 1 次菌落直径(5 次重复), 至菌丝长满培养皿为止。

1.2.2 培养基和菌龄对孢子囊数量的影响试验

(1) 试验方案 用 0.1% KNO₃ 溶液浸泡菌龄为 7、14、21、28、35、42 d 的菌丝, 镜检孢子囊数量。

(2) 试验方法 在超净工作台下, 向不同菌龄且长满菌丝的培养皿中分别加入 6 mL 无菌的 0.1% KNO₃ 溶液, 用封口膜封住培养皿, 放置于 26 °C 恒温条件下避光培养, 分别将培养 12、24、48、72 h 的培养皿转移至温度突然降低 12 °C 的环境下, 恒温培养 0.5 h。然后, 吸取 50 μL 的 KNO₃ 浸泡液转移至洁净的载玻片上, 挑取有代表性约 1 cm² 大小的菌丝放入载玻片的溶液里, 制成孢子囊悬浮液, 在显微镜下(16×40) 随机观察 3 个视野, 计算孢子囊数量的平均值。

1.2.3 诱导剂和诱导时间对孢子囊和游动孢子数量的影响试验 (1) 试验方案 用 0.1% KNO₃ 溶液和 0.1% KNO₃ + 1% 葡萄糖混合液分别浸泡不同菌龄的菌丝, 以无菌水作为对照(CK), 3 次重复, 镜检孢子囊和游动孢子的数量。(2) 试验方法 同 1.2.2, 并用血球计数板法计算游动孢子的浓度。

2 结果

2.1 菌丝菌落及形态特征

用肉眼观察燕麦培养基(OA) 上的供试菌株, 发现菌丝生长旺盛、呈白色, 菌落质地均匀。在显微镜下观察(图 1) 显示, 菌丝粗细不均、无隔膜、有分枝、局部有菌丝膨大体, 其上有若干条放射状菌丝, 其内部有些近乎中空, 还有些含有不明囊状物。孢子囊卵圆形、近球形或不规则形, 通常 1 个、少数 2 个呈半球形的乳突; 部分孢子囊上有丝状附属物, 初期孢子囊看起来较暗, 内部包含颗粒状的游动孢子, 在条件适合时可将其释放。游动孢子椭圆形或圆形, 可在水中游动, 其浓度越高活动性越强。本试验没观察到烟草黑胫病菌赖以度过不良环境的主要形态, 即厚垣孢子。

2.2 菌丝生长与培养基和光照的关系

由表 1 可以看出, 烟草黑胫病菌 0 号生理小种菌丝在 5 种不同培养基上 28 °C 恒温培养的生长趋势基本一致。黑暗条件下以 OA 培养基上的菌丝平均生长速度最快, 生长的菌丝最丰厚、浓密。其次, 是烟叶汁培养基; CMA、TJA 和 PDA 培养基上菌丝的生长速度近乎相同。光照条件下各培养基中菌丝的生长速度与避光条件下相似, 但在同一种培养基上黑暗条件下培养的菌丝生长速度比光照条件下的稍快。本研究选用的 5 种培养基中, 烟草黑胫病菌 0 号生理小种最适于在 OA 培养基上生长, 光照条件下菌丝的生长速度普遍偏慢。

表 1 避光条件下不同培养基上菌丝生长速率

Table 1 The mycelia growth rate of different media under the dark conditions

培养基类型	菌落直径/mm					菌丝生长速率/(mm·d ⁻¹)
	1d	2d	3d	4d	5d	
OA 培养基	10.6	38.3	69.5	82.4	88.0	≥17.6
烟叶汁培养基	9.3	28.5	56.9	71.6	83.1	16.62
CMA 培养基	7.1	20.8	39.5	50.2	65.3	13.06
TJA 培养基	8.4	21.6	37.2	49.8	62.7	12.54
PDA 培养基	9.2	19.7	36.5	48.3	60.2	12.04

2.3 各培养基上不同光照处理病菌的产孢量

供试菌株在 5 种培养基上均能产生孢子囊, 在同一种培养基上不同光照处理的产孢量存在差别,

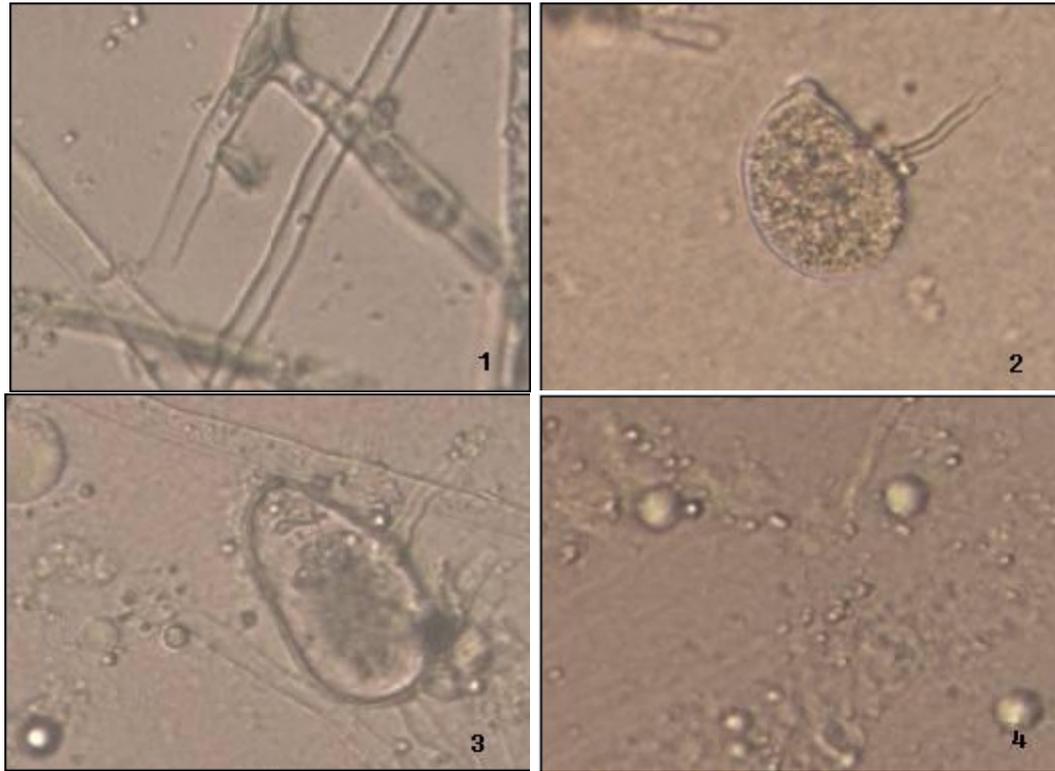


图1 烟草黑胫病菌0号小种的形态: 1.菌丝; 2.孢子囊(含附属丝); 3.释放游动孢子的孢子囊; 4.游动孢子
Fig. 1 Morphology of the tobacco blank shank No.0: 1. Mycelium; 2. Sporangium (including appendage); 3. the sporangium has released four dynamic spore; 4. four dynamic spore

光照条件下菌丝产孢量相对偏少,孢子囊的大小也有所不同。相同光照条件下,OA培养基上孢子囊数量最多,其次是烟叶汁培养基和CMA培养基,TJA和PDA培养基上产孢数量相对较少。避光条件下培养的菌丝产孢量普遍比光照条件下产孢量多,据此可认为,避光培养有助于孢子囊的产生。

2.4 菌龄和产孢量的关系

在OA培养基上,分别对培养7、14、21、28、35和42 d的病菌进行镜检。结果显示,21 d菌龄的菌丝产孢量最多,产孢能力最强;其次是培养14和28 d的菌丝;35、42和7 d的菌丝产孢量依次递减。14和28 d菌龄的菌丝产孢量无明显差异,且与21 d菌龄的菌丝产孢量存在差异。考虑到实际操作、试验周期等因素,选取21 d菌龄的菌丝催孢效果最佳。

2.5 不同菌龄的菌丝产孢量和游动孢子释放量与诱导剂和诱导时间的关系

用高压灭菌的0.1% KNO₃溶液(A液)和0.1% KNO₃+1%葡萄糖混合液(B液)分别浸泡避光培养7、14、21、28、35和42 d生长良好的菌丝,均用等量无菌水作为对照(CK),经过12、24、48和72 h的26℃恒温培养,随即进行14℃、0.5 h的诱导处理。由表2看出,在相同菌龄和相同处理时间下,经A液浸泡的菌丝与对照相比,无菌水处理的菌丝产生的孢子囊数量相对较少;结果还表明,0.1% KNO₃溶液可促使孢子囊的产生;经A、B两液浸泡的菌丝产生的孢子囊数量基本一致,但经B液浸泡的菌丝释放的游动孢子量较多,说明1%葡萄糖溶液对菌丝的催孢子囊作用影响甚微,然而,其可能具有诱导孢子囊释放游动孢子或延长游动孢子活动时间的的作用。

3 讨论

烟草黑胫病发现至今已有110多年的历史,本试验关于烟草黑胫病菌0号生理小种培养性状的研究结果与Waterhouse^[3]、Newhook^[4]、Ho^[5]、Stamps^[6]

表 2 不同诱导剂和诱导时间对菌丝的作用

Table 2 Effects of various inducers and induction times on hyphae

固定项	处理时间	孢子囊数量	游动孢子数量
菌龄相同	不变	A、B 两者孢子囊数量基本一致	B 液处理的菌丝产生的游动孢子数量多
	增加	A、B 两者产孢数量均增加且基本一致，随处理时间的延长产孢量逐渐增多，浸泡 72 h 菌丝产孢量最多	A、B 两者均随处理时间的延长而增加，B 液处理的菌丝产生的游动孢子数量多
A 液	不变	随菌龄增加孢子囊数量先增后减，21 d 菌龄的菌丝产孢量最多；相同菌龄，A、B 两者孢子囊数量差异不显著	随菌龄增加游动孢子数量先增后减，21 d 菌龄的孢子释放量最多；相同菌龄，A、B 两者游动孢子数量差异不显著
	增加	随菌龄增加孢子囊数量先增后减，21 d 菌龄产孢量最多；菌龄相同，产孢数量随处理时间的延长而增加，72 h 孢子囊数量最多	随菌龄增加游动孢子数量先增后减，21 d 菌龄的孢子释放量最多，游动孢子释放量随处理时间的延长而增加
B 液	不变	同 A 液处理时间不变孢子囊数量变化情况	同 A 液处理时间不变游动孢子数量变化情况
	增加	同 A 液处理时间增加孢子囊数量变化情况	同 A 液处理时间增加游动孢子数量变化情况

和郑小波等^[7-8]的研究类似。因此，初步认为生态环境的改变没有导致烟草黑胫病菌的培养性状发生较大变异，即该病菌的培养性状较为稳定^[9]；同时也表明，鉴定保存数十年的烟草黑胫病菌 0 号生理小种的培养特性基本未发生变化。

烟草黑胫病菌 0 号生理小种在燕麦培养基上生长最好，说明菌株对培养基的要求存在差异是病菌长期进化致使其生理机能在一定程度上对营养成分形成定向选择的结果。烟草黑胫病菌在田间发病的条件为高温高湿，自然条件下，病菌首先侵染烟株的根基部，沿茎秆内部的髓蔓延，病菌一直处于避光环境下；光照对菌丝的生长起抑制作用的机理有待于进一步研究。经浸泡的菌丝其内部为何中空或含不明囊状物的原因尚不清楚。21 d 菌龄的菌丝在诱导剂的作用下产生的孢子囊数量最多，可能的原因是，7 d 菌龄的菌丝处于旺长期，组织结构较幼嫩，不适于产生孢子囊；菌丝生长 21 d 后，随着培养时间的延长，菌丝的生理结构发生变化，以致逐渐老化，产孢能力也随之衰退。

郑小波等^[8,10]曾指出烟草疫霉菌部分孢子囊上有附属丝，但有关烟草黑胫病菌的文献^[11-13]中鲜有报道。本研究发现了部分着生附属丝的孢子囊，但附属丝的作用还有待于进一步研究。没有观察到厚垣孢子的可能原因是，在 OA 培养基上病原菌的菌龄太小，没有达到产生厚垣孢子的要求。本研究结果显示 0.1% KNO₃ + 1% 葡萄糖混合液对黑胫病菌丝起较好的诱导作用，其潜在原因是基于人为创造产孢的适宜环境。孢子囊释放游动孢子的原因可归结为：一是在产孢适宜温度下突降 12 °C，刺激孢

子囊释放游动孢子；二是葡萄糖溶液有助于释放游动孢子并延长其活动时间。有报道称，可用土壤浸出液、烟叶汁和不同浓度梯度的 Hoagland 营养液等诱导菌丝产生孢子囊^[14]，随后，催促孢子囊释放游动孢子；然而，上述方法相对麻烦，产孢和催释游动孢子的诱导剂要分步加入，费时费力；同时，多次加入诱导剂，增大了培养过程中杂菌污染的几率。人工注射接种法是吸取游动孢子（浓度为 $1 \times 10^3 \sim 5 \times 10^4$ 个/mL）溶液直接注射到烟株茎基部，在侵染过程中起主要作用的是游动孢子。前人研究显示，游动孢子遇寄主时萌发产生芽管侵入；当条件不适宜时，孢子囊可直接长出芽管侵入寄主^[15]，其作用机理还有待于研究。

4 结 论

烟草黑胫病菌 0 号生理小种对培养基有选择性，燕麦培养基较适于其生长；避光有利于菌丝生长和产孢数量的增加，0.1% KNO₃ 溶液浸泡菌丝有助于孢子囊的产生；1% 葡萄糖溶液可促使孢子囊释放游动孢子或延长其活动时间。适于诱导的最佳菌龄为培养 21 d 的菌丝，加入 0.1% KNO₃ + 1% 葡萄糖混合液置于 26 °C 避光诱导 72 h，然后突降 12 °C 培养 0.5 h，可产生大量游动孢子。在人工创造烟草黑胫病菌菌丝产孢的适宜条件下，混合诱导剂较好地诱导孢子囊的产生，从而获取大量游动孢子，该方法简便快捷，省时省力。

参考文献

- [1] 尚志强. 烟草黑胫病病原发生规律及综合防治研究进

- 展[J]. 中国农业科技导报, 2007(2): 73-76.
- [2] 马国胜, 高智谋, 陈娟. 烟草黑胫病研究进展[J]. 烟草科技, 2003(4): 35-42.
- [3] Waterhouse G M. Key to the species of *Phytophthora de Bary*[J]. Mycological Papers, 1963, 92: 1-22.
- [4] Newhook F J, Waterhouse G M, Stamps D J. Tabular key to the species of *Phytophthora de Bary*[J]. Mycological Papers, 1978, 143: 1-20.
- [5] Ho H H. Synoptic keys to the species of *Phytophthora* [J]. Mycological Papers, 1981, 73: 705-714.
- [6] Stamps D J, Waterhouse G M, Newhook F J. Revised Tabular Key to the Species of *Phytophthora*[J]. Mycological Papers, 1990, 162: 1-28.
- [7] 郑小波, 陆家云. 烟草疫霉两个变种的划分及疫霉属几个生物学性状的研究[J]. 南京农业大学学报, 1989, 12(2): 46-52.
- [8] 郑小波, 陆家云. 福建、浙江、江苏、上海疫霉种的研究[J]. 真菌学报, 1989, 8(3): 161-163.
- [9] 马国胜, 高智谋. 烟草黑胫病菌培养性状的研究[J]. 中国农业科学, 2007, 40(3): 512-517.
- [10] 郑小波. 疫霉菌及其研究技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997.
- [11] Song J H, Roh S H, Park H, et al. Ecological characteristics of *Phytophthora nicotianae* var. *nicotianae* causing *Phytophthora* rot of strawberry and resistance of strawberry cultivars to the pathogen[J]. Korean Journal of Plant Pathology, 1998, 14: 646-650.
- [12] 方中达. 中国农业百科全书: 植物病理学卷[M]. 北京: 农业出版社, 1996: 534-535.
- [13] 孙恢鸿. 烟草病虫害防治图志[M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 2001: 13-15.
- [14] 刘延荣, 谢成颂, 王智发, 等. 烟草黑胫病菌孢子囊形成和游动孢子释放条件的研究[J]. 山东农业科学, 1987(1): 28-30.
- [15] 朱贤朝, 王彦亭, 王智发. 中国烟草病害[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 24-25.

《烟草科技》2010年第12期目次

烟草工艺

- 基于在线冲击的烟气气溶胶浓度检测方法..... 贾伟萍, 鲁端峰, 常纪恒, 等 05
- 片烟结构代表性指标的选取..... 何结望, 王 满, 谢 豪, 等 08
- 灰色关联法分析烟丝对烟支物理指标的影响..... 黄 治, 何 蓉, 谭奇忠, 等 12

设备与仪器

- 卷烟生产线废料回收物流系统建模分析..... 刀荣贵, 张进武, 杨 祥 16
- 基于“一号工程”的件烟分拣入库系统的设计应用..... 刘 峰, 房 华, 李昌权 21
- 基于 RTX 烟支质量在线检测实时系统的设计应用..... 李 健 25
- Super9 卷接机组纸盘架脉冲触发盘的改进..... 柏世绣, 王 萍 29

烟草化学

- 基于多目标决策的卷烟危害性评价..... 彭 斌, 赵 乐, 孙学辉, 等 31
- 烟草中“仲丁灵”残留量及其向烟气中的转移率..... 罗华元, 王绍坤, 董石飞, 等 36
- 烟霜的化学成分分析..... 刘 雷, 严学军 40
- 固相萃取-GC 法同时检测烟田土壤中“敌稗”、“砒啶磺隆”和“喹禾灵”的残留量..... 曾维爱, 刘春来, 邓正平, 等 43
- DRC-ICP/MS 法同时测定卷烟烟丝中 8 种重金属..... 王海利, 汤建国, 孟昭宇, 等 46

烟草农学

- 卷烟纸对卷烟主流烟气中 7 种有害成分释放量的影响..... 郑 琴, 程占刚, 李会荣, 等 49
- 云南品牌卷烟主体烟叶原料的 ISSR 多态性分析及标记..... 张 奇, 吴 田, 梁子荣, 等 52
- 烟梗生物发酵制造有机肥..... 高 明, 郭灵燕, 席 宇, 等 57
- 基于特征向量的烤烟外观质量分类评价..... 魏春阳, 李 锋, 张任祥, 等 61