

# 云南省烟草疫霉生理小种的初步鉴定

李梅云

(云南省烟草农业科学研究院, 云南 玉溪 653100)

**摘要:** 病菌生理小种在不同地区的分布有各自特点, 研究各地的生理小种特点可有的放矢安排品种, 达到防病、抗病的目的。就云南省烟草黑胫病病原进行了分离纯化, 采用根部创伤接种法对部分病原进行了致病性测定与生理小种鉴定。结果表明, 2004年分离的39株烟草黑胫病菌株致病率为22.22%~100.00%, 平均发病率为93.73%, 病情指数2.8~86.1。2005年分离的45株烟草黑胫病菌株致病率为66.67%~100.00%, 平均发病率为96.05%, 病情指数16.7~97.2。2006—2008年对55个地方代表菌株进行生理小种鉴别, 发现55个菌株在不同烟草品种上存在致病力分化, 对同一品种致病力存在差异; 确定有50个菌株为0号生理小种, 占供试菌系的90.91%, 说明云南省烟草黑胫病菌优势菌为0号生理小种, 在本次鉴定的供试菌株中未发现1、2、3号生理小种。

**关键词:** 烟草黑胫病; 致病性; 生理小种; 发病率

中图分类号: S572.08

文章编号: 1007-5119(2012)05-0054-06

DOI: 10.3969/j.issn.1007-5119.2012.05.010

## Race Identification of *Phytophthora Parasitica* var. *Nicotianae* in Yunnan Province

Li Meiyun

(1. Institute of Tobacco Science Research, China Tobacco Breeding Research Southern Center, Yuxi, Yunnan 653100)

**Abstract:** The distribution of pathogen races is distinguished in different region. The study of race in Yunnan Province is benefit to planning tobacco variety with a purpose of disease-resistant and disease-prevent. So pathogenicity and race of the pathogen in Yunnan Province was determinate by the method of injured roots inoculation. The result showed that the incidence of 39 strains isolated in 2004 was from 22.22% to 100.00%, 93.73% in average, the disease index was 2.8~86.1 and the incidence of 45 strains isolated in 2005 was from 66.67% to 100.00%, 96.05% in average, the disease index was 16.7~97.2. The tested 55 isolates differ greatly in pathogenicity to same variety and their pathogenic differentiation was obvious in different varieties. In this paper we concluded that 50 isolates was race 0. Race 0 was the superior race of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* in Yunnan province.

**Keywords:** tobacco black shank; pathogenicity; race; incidence

烟草黑胫病是烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) 生产上的毁灭性病害之一, 是制约我国各烟区烟叶生产的最重要因素<sup>[1-3]</sup>。经验证明, 以抗病品种为中心的综合防治, 能有效控制烟草黑胫病的为害<sup>[4]</sup>。在实施综合防治计划中, 应注意的重要问题之一就是烟草黑胫病菌的变异性。在烟草的生产过程中, 新的高毒力菌系或新的生理小种的出现, 往往使一批抗病品种“丧失”抗病性而成为感病品种, 造成病害大流行。研究烟草黑胫病菌生理小种的变化和组

成及其与寄主抗性间的关系, 对烟草抗黑胫病育种工作极为重要。为此, 笔者所在课题组于2004—2005年从云南各主要产烟州、市分离纯化84株黑胫病菌, 进行了致病性测定, 2006—2008年对55个地方代表菌株进行生理小种鉴别。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验时间、地点

试验于2004—2008年在云南省烟草农业科学

项目来源: 云南省烟草公司计划资助项目(05-06, 2010YN02, 2011YN06); 中国烟草总公司资助项目(110201002001)

作者简介: 李梅云, 女, 副研究员, 硕士, 主要从事烟草病害研究。E-mail: myli2008@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-12-31

修回日期: 2012-08-03

研究院研和试验基地温室与实验室进行。

1.2 试验材料

1.2.1 供试菌株与品种 所有菌株均采自云南各主要产烟地州,于 2004—2005 年间先后分离纯化。鉴别寄主包括 *N. plumbaginifolia*、*N. nudicaulis*、NC1071、L8,抗病对照品种 K326 和感病对照品种小黄金 1025。

1.2.2 培养基与试剂 燕麦液体培养基用于摇床加富培养,固体培养基用于菌株活化与培养,加 0.05 g/mL 氯霉素用于病原的分离与纯化。

蔗糖-柠檬酸-维生素-无机盐 (SCBM) 液体培养基<sup>[3]</sup>:蒸馏水 1000 mL、蔗糖 30 g、柠檬酸 20 g、氯化钙 1.0 g、硝酸钾 2.0 g、磷酸二氢钾 0.67 g、磷酸氢二钾 0.33 g、1%三氯化铁 10 滴、VB1 1 mg。TTC 液体培养基为上述培养基中加入 0.05%TTC; TTC 固体培养基为燕麦琼脂培养基内加入 0.05%TTC。

1%糖标准混合溶液:取果糖、葡萄糖、蔗糖各 1 g,混合后 75%酒精溶解定容至 100 mL。苯胺-二苯胺-磷酸显色剂:1 g 二苯胺溶于 1 mL 苯胺、5 mL 85%磷酸、50 mL 丙酮组成的混合溶液中。漂白粉滤液:称取 10 g 漂白粉溶于 140 mL 水中,过滤。现配现用。

1.3 试验方法

1.3.1 致病性测定 供试菌种燕麦琼脂培养基 28 °C 培养 7 d。烟苗移栽前 2 周,挑取菌丝体接种培养液,120 r/min、28 °C 摇床培养 2 周,骤然降温,制成游动孢子悬浮液。调节游动孢子悬浮液浓度 10<sup>8</sup> CFU/mL,备用。

供试品种漂浮育苗,待烟苗长到 6~8 叶期移栽到塑料花盆 (Φ16 cm) 中,缓苗生长 10 d。

菌株孢子悬浮液灌根接种红花大金元 10 叶期左右大小烟株。具体方法:在烟苗茎基部划一伤口,游动孢子悬浮液灌根接种于伤口处,脱脂棉保湿。每株 15 mL,每菌株设 3 个重复,每重复 15 株,设清水对照,接种 3 d 后开始进行调查,按照严重度分级标准进行分级,计算发病率与病情指数<sup>[5]</sup>。

1.3.2 温室中生理小种的鉴定 从致病性测定试验中挑选出强致病力菌株、中致病力菌株、弱致病力菌株 3 个菌系共 55 个代表菌株进行生理小种鉴定。将供试菌株的游动孢子悬浮液分别接种 6 个供试品种烟苗。每菌株设 3 次重复,另设清水对照,3 d 后开始进行病害分级调查,计算病情指数并根据抗性评价标准<sup>[6]</sup>进行抗性评价。结合前人烟草黑胫病菌 0、1、2 和 3 号小种的寄主反应<sup>[3,7-11]</sup>判断生理小种类型 (表 1)。

表 1 烟草黑胫病菌 0、1、2 和 3 号小种的寄主反应  
Table 1 Host reaction of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* race 0, 1, 2 and 3

寄主名称	病害反应				特殊反应
	0 号小种	1 号小种	2 号小种	3 号小种	
L8	R	S	R	MS	叶对 0 号小种感病
NC1071	R	S	-	R	
<i>N. nudicaulis</i>	R	S	-	-	
<i>N. plumbaginifolia</i>	R	S	-	-	

注: R 为抗病, MS 为中感, S 为感病。下同。

1.3.3 生理生化鉴定 根据温室生理小种鉴定结果,从中取代表菌株 18 个,包括各种抗感病反应类型,分别用三氯苯基四唑氮 (TTC) 法与硅胶层析法对烟草黑胫病菌菌株所属生理小种进行鉴别。

供试菌株在 TTC 固体培养基平板上的颜色变化:TTC 法测定的病菌在 SCBM 固体 (pH 5.5) 培养基 28 °C 恒温培养,培养基分别加 TTC (0.05%,

w/v) 和不加 2 种处理,定期观察菌落生长和颜色反应。每处理设 3 个重复,以不加 TTC 的燕麦琼脂培养基为对照,观察颜色反应。

硅胶 G 层析分析各菌株中的糖分:用于硅胶层析的菌悬液来自 SCBM 液体培养。取培养 9 d 的菌悬液准备病菌菌株层析样品时,菌悬液先用纱布过滤,去掉菌丝体,液体部分离心 (700 rpm, 10 min)

沉淀剩余菌体，上清液作为层析样本使用。没有培养过病菌的培养基原液同样离心，上清液用作对照。用移液器吸取样品 1.5 μL 点样，吹干。将一端放入盛有展层溶剂的层析缸中，当展层溶剂到达距薄析顶端约 1 cm 处时取出薄板，60 °C 烘箱烘干，显色。标注液为 1% 的蔗糖、葡萄糖和果糖混合溶液，展层剂溶液含正丁醇、冰醋酸、乙醚和水 (9:6:3:1)，显色剂为苯胺 - 二苯胺 - 磷酸显色剂。层析完成后计算 R<sub>f</sub> 值，公式为 R<sub>f</sub> = h/H，其中，h 为原点到色斑中心距离，H 为原点到展层剂前沿的距离。

## 2 结果

### 2.1 致病性

2004 年分离的 39 株烟草黑胫病菌致病率 22.22%~100%，平均发病率 93.73%，未接种植株没有发病。病指 2.8~25.0 有 17 株，占总菌株数的 43.59%；病指 25.1~60.0 有 10 株，占 25.64%；病指 60.1~100.0 有 12 株，占 30.77%。2005 年分离的 45 个菌株致病率在 66.67%~100%，平均发病率为

96.05%，未接种植株没有发病。病指 16.7~25.0 有 7 株，占 15.56%；病指 25.1~60.0 有 10 株，占 22.22%；病指 60.1~80.0 有 20 株，占 44.44%；病指 80.1~100.0 有 8 株，占 17.78%。

### 2.2 生理小种的初步鉴定

对照烟草黑胫病菌 0、1、2 和 3 号小种的寄主反应 (表 2)，供试 55 个菌株中，第 1 种反应类型 33 个菌株可确定为 0 号生理小种，第 2 种反应类型 9 个菌株和第 3 种反应类型 8 个菌株对 NC1071、*N. nudicaulis* 和 *N. plumbaginifolia* 抗病，但由于 L8 品种的叶对 0 号生理小种感病，根据寄主对病菌的抗性，可以判断这 17 个菌株为 0 号或 3 号生理小种，究竟是 0 号还是 3 号小种可通过生理生化方法判断。剩余的 5 个菌株中 51~54 号 4 个菌株对 L8 表现抗病，说明它们不是 1 或 3 号生理小种，28# 菌株对 L8 与 NC1071 表现中感，对 *N. nudicaulis* 和 *N. plumbaginifolia* 表现抗病，究竟是属于新的分化类型还是由于它们的致病力悬殊引起的，需进一步鉴定。

表 2 各分离菌株生理小种的初步鉴定

Table 2 Preliminary race identification of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*

反应类型	鉴别寄主						生理小种	菌株
	L8	NC1071	<i>N. nudicaulis</i>	<i>N. plumbaginifolia</i>	K326	小黄金 1025		
I	R	R	R	R	R	S	0	05P50、05P66、113#、P225、05P12、233#-2、05P03、05P02、115#、218#、05P31、81902、98#、05P17、62902、123#、05P35、62803、233#-4、193#、42#、ZTLD01、05P04、05P213、112#、LJYS01、220#、62801、05P113、05P07、72901、05P01、170#
II	MS	R	R	R	R	S	0 或 3	05P211、05P59、235#-4、05P207、42#、109#、05P47、120#、05P67、
III	S	R	R	R	R	S	0 或 3	05P226、05P213、239#、05P33、05P22、119#-3、26#、05P32
IV	R	R	MS	R	MS	MS		05P210
V	R	R	R	MS	R	MS		62804
VI	R	MS	R	R	R	MS		203#、109#
VII	MS	MS	R	R	R	MS		28#

### 2.3 生理生化鉴定

2.3.1 供试分离物在 TTC 固体培养基平板上的颜色变化 18 个菌株在 TTC 固体培养基中均产生变色反应 (图 1、表 3)。各分离物在 TTC 固体培养基上生长时，先移入的菌块呈红色，继而伸入基质的菌丝变色，自培养皿背面观察菌落扩展呈放射状，外缘菌丝颜色稍浅，气生菌丝均为白色絮状。显微

镜下观察与一般菌丝相似，无颜色变化及生长差异。生长 120 h 后，05P47、05P66、28# 三个分离物的菌丝颜色较浅，05P22、05P33、05P35、05P59、26#、62803 分离物的菌丝颜色稍浅，但这些分离物的气生菌丝都茂盛，这可能与分离物在燕麦琼脂培养基上的代谢特点有关。

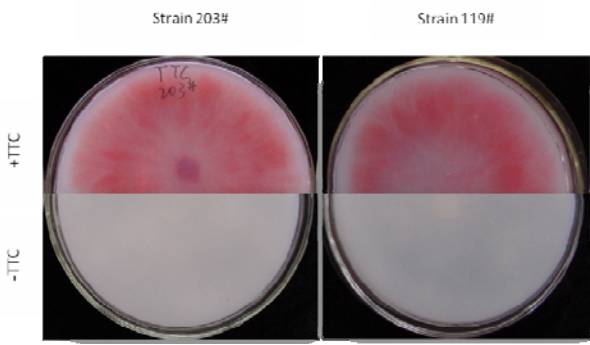


图 1 分离物在 TTC 培养基的变色反应  
Fig. 1 Color change of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* (Ppn) strains

在燕麦+TTC 固体培养基上生长时,烟草黑胫病菌 0 号和 1 号小种产生脱氢酶,该酶作用于 TTC 产生红色脂溶性化合物(图 1),另外两个小种不产生脱氢酶,用含 TTC 培养基培养时不显红色<sup>[12]</sup>。根据培养基的显色反应区别烟草黑胫病菌小种时,通常观察到 72 h 即做出能否显色的判断。根据培养物引起“燕麦+TTC”固体培养基颜色变化的情况,18 个待测菌株均显示 0 号和 1 号小种的特征。

2.3.2 硅胶 G 层析分析各分离物培养滤液中的糖分 硅胶层析是鉴定烟草黑胫病菌生理小种的重要方法,通过检测病菌利用碳水化合物的代谢产

表 3 各分离物在 TTC 固体培养基随时间的颜色变化  
Table 3 Color change with time after incubating Ppn on TTC medium

菌株	2 h		12 h		24 h		48 h		72 h		96 h		120 h	
	TTC	CK	TTC	CK	TTC	CK	TTC	CK	TTC	CK	TTC	CK	TTC	CK
05P17	-	-	+	-	+	-	++	-	++	-	+++	-	+++	-
05P22	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	++	-
05P32	-	-	+	-	+	-	++	-	++	-	+++	-	+++	-
05P33	-	-	-	-	+	-	++	-	++	-	++	-	++	-
05P35	-	-	+	-	+	-	++	-	++	-	++	-	++	-
05P47	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
05P50	-	-	+	-	++	-	+++	-	+++	-	+++	-	+++	-
05P59	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	++	-	++	-
05P66	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
05P67	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	++	-	++	-
05P207	-	-	+	-	+	-	++	-	++	-	+++	-	+++	-
05P211	-	-	+	-	+	-	++	-	+++	-	+++	-	+++	-
26#	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	++	-	++	-
28#	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
119#-3	-	-	+	-	++	-	+++	-	+++	-	+++	-	+++	-
120#	-	-	+	-	+	-	++	-	++	-	+++	-	+++	-
03#	-	-	+	-	++	-	+++	-	+++	-	+++	-	+++	-
03	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	++	-	++	-

注“-”为无色;“+”为微红;“++”为浅红色;“+++”为深红色。

物,帮助判断小种归属。硅胶层析试验通常使用标准的糖溶液,与待测样本同时进行试验,根据层析带型和用作标准的糖类在层析板上的迁移率(Rf),通过比较,确认待测样本所含糖的种类。对照表 4 对比各色斑颜色和 Rf 值大小证实 A 为葡萄糖、B 为果糖、C 及原液 CK 为蔗糖。D 色斑的 Rf 值最小且与其他值有明显差异,其色斑颜色也与标准样的任何一种不相同,据 John L. McIntyre 的报道应为蔗糖。据报道只有黑胫病菌 0 号和 1 号小种经代谢能产生蔗糖,3 号小种不能产生。我们试图用这个方法鉴别云南菌株是 0 号还是 1 号小种,结

果表明,18 个待测菌株均能产生蔗糖,仍然只能归为 0 号或 1 号小种(图 2,表 4)。无论是层析带型还是 Rf 值的相对大小,都表明来自云南的 18 个菌株即符合 0 号小种的特征,也符合 1 号生理小种的特征,与 TTC 培养基鉴别结果一致。

### 3 讨论

依据鉴别寄主的反应,1~33 号菌株鉴定结果为 0 号生理小种;34~50 号菌株依据鉴别寄主的反应,为 0 号或 3 号生理小种,TTC 培养基、硅胶 G 薄层层析的鉴定结果否定了它们为 3 号生理小种的可

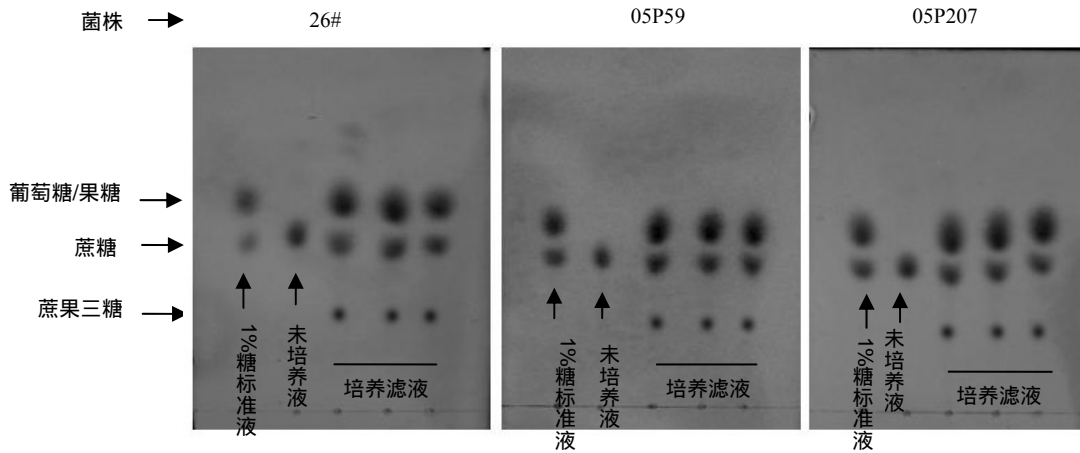


图2 各供试菌株硅胶G层析后现色结果

Fig. 2 Thin-layer silica gel chromatography on glass plates was used to visualize products

表4 层析板色斑 Rf 值比较

Table 4 Rates (Rf values) of sugar flow during thin-layer silica gel chromatograph

点样液	糖类	Rf								
		05P17	05P22	05P32	05P33	05P35	05P47	05P50	05P59	05P66
标准糖溶液	果糖	0.4779	0.5143	0.4868	0.3881	0.4028	0.5652	0.4545	0.5135	0.5075
	葡萄糖	0.5000	0.5571	0.5263	0.4478	0.4444	0.5870	0.5152	0.5541	0.3433
	蔗糖	0.3529	0.3714	0.3816	0.2985	0.2911	0.4275	0.3485	0.3999	0.5050
病菌培养物无 菌上清液	A(果糖)	0.5024	0.5553	0.5219	0.4527	0.4398	0.5821	0.5091	0.5450	0.4688
	B(葡萄糖)	0.4754	0.5119	0.4781	0.3930	0.4027	0.5604	0.4621	0.5113	0.3383
	C(蔗糖)	0.3480	0.3666	0.3791	0.2985	0.2893	0.4227	0.3485	0.3874	0.1890
	D(蔗果三糖)	0.2255	0.2214	0.2258	0.1816	0.1750	0.2488	0.2323	0.2140	0.3358
原液(CK)	蔗糖	0.3603	0.3643	0.3816	0.2985	0.2911	0.4203	0.3436	0.3884	0.4702

点样液	糖类	Rf								
		05P67	05P207	05P211	62803	26#	28#	119#-3	120#	203#
标准糖溶液	果糖	0.4485	0.4615	0.4779	0.5000	0.5224	0.4571	0.4366	0.4891	0.5467
	葡萄糖	0.4706	0.5077	0.5294	0.5429	0.5821	0.4929	0.4648	0.5474	0.5800
	蔗糖	0.3235	0.3385	0.3676	0.3643	0.3776	0.3500	0.3239	0.3504	0.4440
病菌培养物无 菌上清液	A(果糖)	0.4681	0.4974	0.5245	0.5453	0.5776	0.4905	0.4597	0.5425	0.5751
	B(葡萄糖)	0.4461	0.4564	0.4706	0.5095	0.5248	0.4571	0.4302	0.4940	0.5433
	C(蔗糖)	0.3183	0.3383	0.3676	0.3738	0.3806	0.3452	0.3195	0.3553	0.4383
	D(蔗果三糖)	0.2010	0.1820	0.2010	0.2119	0.2239	0.2214	0.1972	0.1947	0.2445
原液(CK)	蔗糖	0.3162	0.3308	0.3706	0.3728	0.3806	0.3500	0.3211	0.3577	0.4373

能,说明 L8 表现中感或感病是因为 L8 叶片的特殊反应引起的,由此确定 34~50 号菌株为 0 号生理小种;51~54 号 4 个菌株对 L8 表现抗病,说明它们不是 1 或 3 号生理小种,它们对 NC1071、*N. nudicaulis* 和 *N. plumbaginifolia* 中的 2 个鉴别寄主表现抗病,对另外 1 个鉴别寄主表现中度感病,也不完全符合 0、2 号生理小种的判断;28#菌株对 L8 与 NC1071 表现中感,对 *N. nudicaulis* 和 *N. plumbaginifolia* 表现抗病,所以不是 1 号生理小种,根据 TTC 培养基

与硅胶层析鉴定结果,应为 0 号或 1 号生理小种,51~55 号菌株究竟是不是 0 号生理小种还是属于新的分化类型,还是由于他们的致病力悬殊引起的,需要进一步深入研究。根据以上研究结果,供试 55 个烟草黑胫病菌中有 50 个菌株为 0 号生理小种,占供试菌系的 90.91%,由此说明云南省烟草黑胫病菌优势菌为 0 号生理小种,在本次鉴定的供试菌株中未发现 1、2、3 号生理小种。

黑胫病菌 0 号、1 号小种可以使 TTC 培养基变色,其基本机制是脱氢酶与 TTC 发生氧化还原反应生成有色物。至于 TTC 与脱氢酶作用的具体机制,染色深浅与 TTC 含量、培养基成分有无直接或间接关系尚待进一步研究。黑胫病菌能分泌水解酶,将蔗糖水解为果糖、葡萄糖而被同化,蔗果三糖由两个果糖和一个葡萄糖组成。至于该复合物究竟在生化反应过程中的哪一个步骤产生有待进一步研究。

#### 参考文献

- [1] 杨建卿,江彤,陈学平,等. 不同香料烟品种和品系对烟草黑胫病菌的抗病性研究[J]. 中国烟草学报,2001,7(3):34-36.
- [2] 王智发,刘延荣,谢成颂,等. 山东省烟草黑胫病菌生理小种初步鉴定[J]. 植物保护学报,1985,12(1):51-55.
- [3] 王智发,刘延荣,谢成颂,等. 我国烟草黑胫病菌生理小种鉴定[J]. 山东农业大学学报,1987,18(1):1-8.
- [4] 张竹林. 抗烟草黑胫病品种(系)试验简报[J]. 烟草科技,1995(1):38-39.
- [5] 任广伟,孔凡玉,王凤龙,等. GB/T 23222—2008 烟草病害分级及调查方法[S]. 北京:中国标准出版社,2008.
- [6] 孔凡玉,王凤龙,张成省,等. GB/T 23224—2008 烟草品种抗病性鉴定[S]. 北京:中国标准出版社,2008.
- [7] McIntyre J L, Taylor G S. Race 3 of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*[J]. Phytopathology, 1978, 68(1): 35-38.
- [8] 朱贤朝,郭振业,刘保安. 山东省烟草黑胫病菌中出现 0 号和 1 号小种的分化[J]. 中国烟草,1986(2):8-10.
- [9] McIntyre J L, Taylor G S. Screening tobacco seedling for resistance to *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*[J]. Phytopathology, 1976, 66: 70-73.
- [10] Stokes G W, Litton C C. Source of black shank resistance in tobacco and reaction to race 0 and 1 of *phytophthora parasitica* var. *nicotianae*[J]. Phytopathology, 1966, 56: 678-680.
- [11] Wills W H, Moore L D. Response of some cultivars and lines of tobacco to stem inoculation with *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*[J]. Tobacco Science, 1971, 4: 51-53.
- [12] McIntyre J L, Hankin L. Lack of kestose production by race 3 of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* differentiates it from races 0 and 1[J]. Mycologia, 1977, 69: 756-760.