

## 番茄晚疫病病原菌的菌落生长和产孢子条件的研究

黄晓梅<sup>1</sup>, 梁艳<sup>2</sup>, 陈秀玲<sup>3</sup>

<sup>1</sup>黑龙江农业职业技术学院, 黑龙江佳木斯 154007;

<sup>2</sup>齐齐哈尔大学, 黑龙江齐齐哈尔 161006; <sup>3</sup>东北农业大学, 哈尔滨 150030)

**摘要:** 为了提高番茄晚疫病病原菌的菌落生长速度和产孢子数量, 用佳木斯地区番茄晚疫病植株上分离、纯化的晚疫病病原菌, 分别在不同培养基、pH、糖浓度、温度条件下培养, 研究番茄晚疫病病原菌菌落生长和产孢子的最佳培养条件。结果表明, 黑麦培养基最适宜菌落生长及产孢, 最适菌落生长 pH 值为 6.0~7.0, 最适产孢子 pH 值为 6.5, 孢子生长的最适温度为 20℃, 培养基中添加蔗糖 80 g/L 时菌落生长快, 产孢量大。

**关键词:** 番茄; 晚疫病; 菌落; 孢子

中图分类号: S6

文献标志码: A

论文编号: 2011-0189

### Research on Late Blight Disease Germ Colony Growth and Sporulation Conditions of Tomato

Huang Xiaomei<sup>1</sup>, Liang Yan<sup>2</sup>, Chen Xiuling<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Heilongjiang Agricultural Vocational and Technical College, Jiamusi Heilongjiang 154007;

<sup>2</sup>Qiqihar University, Qiqihar Heilongjiang 161006; <sup>3</sup>Northeast Agricultural University, Harbin 50030)

**Abstract:** In order to improve tomato late blight pathogen colony growth rate and spore production quantities, this research cultured the separated, purified late blight pathogen from Jamusi local tomato late blight plants, respectively in different media, pH, sugar concentration, temperature conditions, then researched tomato late blight pathogen growth and the best yielding the spore colonies conditions. The results showed that the rye culture medium was suitable for the colony growth and sporulation, the most suitable pH value for the colony growth was 6.0–7.0, the most suitable pH value for the sporulation was 6.5, and the optimum temperature for spore growth was 20℃. When the medium contained 80 g/L sucrose, the colony grew fastest and sporulation was also the greatest.

**Key words:** tomato; late blight; colony; spore

### 0 引言

番茄晚疫病是疫霉属中的致病疫霉 [*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary] 浸染所致<sup>[1-3]</sup>, 影响范围波及全世界, 近年来, 随着番茄保护地栽培面积的扩大, 番茄晚疫病呈逐年加重的趋势, 现已成为周年发生的重要病害之一, 造成极大的经济损失, 对于番茄晚疫病的研究大多限于病害发生原因、病症描述和病害流行与防治等方面<sup>[4-6]</sup>。番茄晚疫病病原菌的生理分化相当复杂, 不同寄主、不同地域或生态环境均能影响其分化, 而且病原菌容易发生变异, 导致毒性、侵染力和寄主范围等特

性发生改变。目前国内外对番茄晚疫病病原菌生理小种的鉴定有一定的报道, 美国、加拿大、墨西哥等国家已对本国的晚疫病病原菌生理小种的组成及分布进行了广泛深入的研究<sup>[7-10]</sup>, 中国番茄晚疫病病原菌群体的生理小种发生与分布情况尚无完整的鉴定结果, 已有的实验结果比较分散, 中国农科院蔬菜花卉研究所冯兰香等对中国大陆 18 个省、市、自治区的 201 个番茄晚疫病病原菌株进行生理小种鉴定<sup>[11]</sup>; 余文贵等对采自江苏省的 35 个番茄晚疫病病原菌株进行生理小种鉴定<sup>[12]</sup>; 罗小波等对成都市番茄晚疫病病原菌进行生理小种鉴定<sup>[13]</sup>。

**基金项目:** 黑龙江省教育厅项目“番茄晚疫病病原菌的鉴定及抗病种质资源的筛选”(10555052)。

**第一作者简介:** 黄晓梅, 女, 1966 年出生, 教授, 博士, 研究方向: 抗病育种, 通信地址: 150047 黑龙江省佳木斯市前进区胜利路 52 号, E-mail: xmh1067@yahoo.cn。

**收稿日期:** 2011-01-17, **修回日期:** 2011-03-21。

番茄晚疫病是寄生性较强的病原真菌,分离纯化相当困难<sup>[14]</sup>,为进一步明确番茄晚疫病病菌的生物学特性,探讨病菌的侵染特点,采用培养基培养的方法对采集分离的番茄晚疫病病菌的菌落生长和产孢条件进行初步研究,以便为番茄晚疫病的防治提供理论依据和实践操作技术。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 番茄晚疫病材料 在佳木斯地区番茄产区采集番茄晚疫病症状明显,无污染的果实,作为试验材料。

1.1.2 试剂 磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、巴比妥钠、盐酸等化学试剂均为化学纯。

### 1.2 方 法

1.2.1 病原菌的分离与纯化 分离纯化方法参照田苗英<sup>[15]</sup>、吴涛<sup>[16]</sup>方法,病果用0.1%升汞消毒5 min,无菌水冲洗2~3次,从病健交界处切取一小块病组织,接种于黑麦培养基上,置于18~22℃条件下,倒置黑暗培养2~3天后,挑取上述培养果实组织块上长出的菌丝,显微镜下观察孢子形态及特征,并鉴定为 *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary,将其接种在黑麦培养基上黑暗培养,7~10天后,配制孢子悬浮液,挑单个孢子囊纯化病原菌,然后用黑麦培养基扩繁备用。

### 1.2.2 不同因子对番茄晚疫病病菌生长及产孢的影响

#### (1)培养基对菌落及产孢的影响

选用黑麦、燕麦、马铃薯、番茄、胡萝卜、玉米6种培养基,pH为6.0。培养基灭菌后接种晚疫病病原菌。

#### (2)温度对菌落及产孢的影响

以黑麦为基本培养基,培养基灭菌后接种晚疫病病原菌。分别置于5℃,10℃,15℃,20℃,25℃,30℃,35℃,40℃条件下培养。

#### (3)pH值对菌落及产孢的影响

用磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液(5.0,5.5,6.0,6.5)和巴比妥钠-盐酸缓冲液(7.0,7.5),调黑麦培养基的pH,培养基灭菌后接种。

#### (4)糖浓度对菌落及产孢的影响

以黑麦为基本培养基,分别加入20 g/L,40 g/L,60 g/L,80 g/L,100 g/L蔗糖。以不加蔗糖的培养基为对照,培养基灭菌后接种。

接种方法:将相同菌龄的菌用直径0.6 cm的打孔器取下小圆片,接种于平板的中央,每个处理重复三次。以20℃的黑暗条件培养6天,观察菌落的直径和产孢量。菌落直径用直尺测量,孢子数量用血球计数板计数。

1.2.3 数据处理 数据采用 Microsoft Excel(2003)和

SPSS(17.0)统计软件进行处理,进行方差分析和差异显著性检验(Duncan's multiple range tests),显著检验水平设  $P \leq 0.05$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 培养基对晚疫病病原菌菌落及产孢的影响

不同培养基处理结果表明(表1),番茄晚疫病病原菌菌落在黑麦和玉米培养基上生长显著好于其他培养基,供试的六种培养基上均能正常产孢,其中以黑麦培养基孢子数量最多,平均  $5.73 \times 10^5$  个/cm<sup>2</sup>,显著优于其他各处理。黑麦培养基菌落直径和孢子量显著优于其他各处理。此外,研究表明,番茄培养基处理的孢子生长情况最差,孢子生长缓慢,且孢子直径和孢子数量最小。

表1 培养基对菌落生长和孢子量的影响

处理代码	培养基	菌落直径/cm	孢子量 ( $\times 10^5$ 个/cm <sup>2</sup> )
1	黑麦	5.68±0.101a	5.73±0.067a
2	燕麦	1.00±0.081d	2.69±0.064d
3	马铃薯	1.32±0.024c	2.63±0.033d
4	番茄	0.90±0.035d	1.33±0.033f
5	胡萝卜	2.21±0.035b	3.60±0.115ce
6	玉米	5.62±0.097a	4.63±0.033b

注:平均值±标准差;小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

### 2.2 温度对病原菌菌落及产孢的影响

温度处理结果表明(表2),番茄晚疫病病原菌在15~30℃培养条件下均能正常产孢,其中25℃处理最适合产孢,产孢量达到  $6.37 \times 10^5$  个/cm<sup>2</sup>,孢子生长旺盛,培养6天菌落平均直径达到8.00 cm,孢子量和孢子直径显著优于其他各处理,20℃、30℃时的菌落直径和产孢量差异不显著,仅次于25℃,并且菌丝生长较为旺盛;

表2 温度对菌落生长和孢子量的影响

处理代码	温度/℃	菌落直径 /cm	孢子量 ( $\times 10^5$ 个/cm <sup>2</sup> )
1	5	2.06±0.053e	0.69±0.012f
2	10	2.26±0.088d	0.87±0.042e
3	15	6.49±0.024c	1.67±0.042d
4	20	7.61±0.024b	3.19±0.042b
5	25	8.00±0.000a	6.37±0.031a
6	30	7.59±0.064b	2.89±0.042c
7	35	2.21±0.099d	0.82±0.020e
8	40	0.00	0.00

注:平均值±标准差;小写字母表示差异显著( $P \leq 0.05$ )。

温度低于15℃只能产生极少量的孢子,温度达到40℃时不能产生孢子。

### 2.3 pH值对病原菌菌落及产孢的影响

pH处理结果表明(表3),pH值为5.0~7.5的范围内番茄晚疫病病原菌均可正常生长,其中pH值为6.5时孢子生长旺盛,菌落直径和产孢量均为最大,平均产孢量为 $7.93 \times 10^5$ 个/cm<sup>2</sup>,菌落直径为8.07 cm,孢子量显著优于其他各处理,其次为pH值为7.0处理,产孢量显著优于pH值为5.0、5.5、6.0、7.5的处理,菌落直径除与pH值为6.5时差异不显著外,显著优于其他处理,整体来看,最适菌落生长pH值为6.0~7.0,培养基pH值为6.5时番茄晚疫病病原菌菌落生长和产孢效果最好。

表3 pH值对菌落生长和孢子量的影响

处理代码	pH	菌落直径/cm	孢子量/( $\times 10^5$ 个/cm <sup>2</sup> )
1	5.0	4.89±0.031e	3.05±0.061f
2	5.5	6.15±0.031d	4.17±0.061e
3	6.0	7.85±0.071b	5.86±0.040c
4	6.5	8.07±0.031a	7.93±0.083a
5	7.0	7.99±0.061a	6.34±0.087b
6	7.5	6.28±0.072c	4.71±0.081d

注:平均值±标准差;小写字母表示差异显著( $P \leq 0.05$ )。

### 2.4 蔗糖浓度对病原菌菌落及产孢的影响

蔗糖浓度处理结果表明(表4),0~100 g/L糖浓度处理下均可正常产生孢子,但菌落生长情况差异较大,其中80 g/L蔗糖浓度处理下菌落直径最大,显著优于其他各处理,其次为60 g/L处理,菌落直径显著好于其他处理,80 g/L蔗糖浓度处理下,孢子生长旺盛,产生孢子量最大,产孢子量与60 g/L的蔗糖处理差异不显著,但显著优于其他个处理,综合来看,培养基中添加80 g/L的蔗糖,番茄晚疫病病原菌生长效果最佳。

表4 糖浓度对菌丝生长和孢子量的影响

处理代码	糖浓度/(g/L)	菌落直径/cm	孢子量/( $\times 10^5$ 个/cm <sup>2</sup> )
1	0	3.6±0.031f	3.03±0.120e
2	20	5.5±0.031e	6.10±0.153d
3	40	6.3±0.110d	9.27±0.267b
4	60	7.2±0.023b	13.60±0.231a
5	80	7.9±0.020a	14.13±0.406a
6	100	6.5±0.031c	7.10±0.153c

注:平均值±标准差;小写字母表示差异显著( $P \leq 0.05$ )。

## 3 结论与讨论

番茄晚疫病是中国多发的毁灭性病害,已经引起广大学者的高度关注。病原菌生物学特性、诱导抗病性、组织学和细胞学、分子生物学等方面已经取得一定的进展,今后必须加强基础理论方面和生产中的研究,如番茄晚疫病病原菌致病机理、毒素和致病酶作用、植物保卫素的种类、结构式以及植物保卫素的抗病作用等。此外对全国范围内各地区晚疫病病原菌的生理小种进行鉴定,摸清晚疫病病原菌生理小种的分布情况与发生频率也是亟待解决的问题,而本研究为这些研究提供了前期的基础和保障。

番茄晚疫病病原菌生长势相对其他菌较弱,极易被污染,本研究为避免接种过程中出现假阳性,首先采用回接方法接种将番茄晚疫病病原菌进行复壮、分离与纯化,分离纯化方法简单易于操作。系统研究了各种因素对病原菌菌丝生长和产孢量的影响,初步确定最适于菌丝生长和产孢的温度、培养基类型、pH和蔗糖添加浓度,为明确番茄晚疫病病原菌的生物学特性,探讨病原菌的侵染特点,为番茄晚疫病的病害发生与防治提供理论依据,同时为今后的番茄育种工作奠定坚实的理论和实践基础。

本研究表明,25℃是番茄晚疫病病原菌丝生长和产孢的最适温度,这与康立功<sup>[17]</sup>、姜晓艳<sup>[18]</sup>的20℃为最适培养温度的研究结果略有不同,分析其原因可能一是病原菌的生理小种不同,二是病原菌培养pH、光照、碳源浓度等条件不同所导致的。本试验得出最佳培养基为黑麦培养基,这与前人研究结果一致<sup>[16-18]</sup>,此外,研究表明添加80 g/L的蔗糖有利于产孢,以往的研究多集中在碳源的种类上,对于较适宜的碳源蔗糖浓度的研究却未见报道,本试验结果为番茄晚疫病病原菌丝培养和产孢子,提供了适宜的蔗糖添加浓度,本研究对于番茄晚疫病病原菌丝生长和产孢培养作了初步研究,但对于因子间互作,如温度、pH值、碳源等因子的互作效应有待进一步探讨。

## 参考文献

- [1] 吕佩珂.中国蔬菜病虫害原色图谱[M].北京:农业出版社,1998.
- [2] 赵统敏,邹茶英,余文贵,等.番茄晚疫病及其抗病育种研究[J].江苏农业学报,2006,22(2):175-180.
- [3] Beckett M C, Daughtery M L, Fry W E. Epidemiology and Management of Petunia and Tomato Late Blight [J]. Plant Disease Sep,2005,89(9):1000.
- [4] William E, Stephen b G. Re-emergence of potato and tomato late blight in the United States[J]. Plant Disease,1997,81(12):1349-1357.
- [5] Hartman G L, Huang Y H. Characteristics of Phytophthora

- infestans isolates and development of late blight on tomato in Taiwan[J]. Plant Disease, 1995, 79(8): 849-852.
- [6] Erinile I D, Quimv J G. An epiphytotic of late blight of tomato in Nigeria[J]. Plant Disease, 1998, 64(7): 701-702.
- [7] Lebecka R. Host-pathogen interaction between *Phytophthora infestans* and *Solanum nigrum*, *S. villosum*, and *S. scabrum*[J]. European Journal of Plant Pathology, 2008, 120(3): 233-240.
- [8] Haverkort A J, Struik P C, Visser R G F, et al. Societal Costs of Late Blight in Potato and Prospects of Durable Resistance Through Cisgenic Modification[J]. Potato Research, 2009(52): 249-264.
- [9] Möller K, Dilger M, Habermeyer J, et al. Population studies on *Phytophthora infestans* on potatoes and tomatoes in southern Germany European[J]. Journal of Plant Pathology, 2009, 4(124): 659-672.
- [10] Howard S J, Reena D N, Audrey M V, et al. Gene expression changes during asexual sporulation by the late blight agent *Phytophthora infestans* occur in discrete temporal stages[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2009, 2(281): 193-206.
- [11] 冯兰香, 杨宇红, 谢丙炎, 等. 中国 18 省市番茄晚疫病病原生理小种的鉴定[J]. 园艺学报, 2004, 31(6): 758-761.
- [12] 余文贵, 邹茶英, 赵统敏, 等. 江苏番茄晚疫病病原小种鉴定及品种抗性筛选[J]. 江苏农业学报, 2007, 23(6): 618-621.
- [13] 罗小波, 师正彬, 郭江洪, 等. 成都市番茄晚疫病病原生理小种的初步研究[J]. 西南农业学报, 2007, 20(5): 1142-1143.
- [14] Wang T C. Studies on host resistance, Training Workshop on Tomato Late Blight Research in China. In: Stit- ute of Vegetables and Flowers 11[J]. Chinese Academy of Agricultural Science, 2003: 38-39.
- [15] 田苗英, 冯兰香. 番茄晚疫病病原的分离与纯化[J]. 植物保护, 2000, 26(5): 36.
- [16] 吴涛, 朱海山. 番茄晚疫病病原的分离、扩繁及人工接种研究[J]. 云南农业大学学报, 2005, 20(5): 655-658.
- [17] 康立功, 姜景彬, 李景富, 等. 番茄晚疫病病原菌生物学特性研究(II)[J]. 东北农业大学学报, 2008, 39(11): 23-27.
- [18] 姜晓艳, 李海涛, 张子君, 等. 番茄晚疫病病原菌生物学特性研究[J]. 河南农业科学, 2008, 8: 91-94.