

研究报告

培养条件对马铃薯晚疫病菌卵孢子产生的影响*

朱杰华¹ 张志铭¹ 丁明亚² 李玉琴¹ 杨军玉¹

(河北农业大学植保系 保定 071001)¹

(河北承德市围场县原种场 承德 067000)²

摘要: 马铃薯晚疫病菌 (*Phytophthora infestans*) 在我国能够进行有性生殖产生卵孢子^[1], 研究了离体培养时培养基成份、温度、光照及 pH 值对卵孢子产生的影响。结果表明: 白云豆培养基、小米培养基和大豆培养基均适合卵孢子的产生, 产生的数量为 131.6~149.6 个/cm², 但冰冻豌豆培养基不适合卵孢子的产生, 产生的数量仅为 5.8 个/cm²。比较不同 pH 值、不同温度、不同光照条件对卵孢子产生的影响发现, pH 值为 7、温度为 18℃, 黑暗培养最适合卵孢子的产生, 强酸或强碱的环境对卵孢子产生均不利。在日光灯或近紫外光光照 12h 与 12h 黑暗交替情况下培养也不能产生卵孢子。

关键词: 马铃薯晚疫病菌, 卵孢子, 培养条件

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)05-0317-04

THE INFLUENCE OF DIFFERENT CULTURAL CONDITIONS TO THE OOSPORE FORMATION

ZHU Jie-Hua¹ ZHANG Zhi-Ming¹ DING Ming-Ya² LI Yu-Qin¹ YANG Jun-Yu¹

(Department of Plant Pathology of Hebei Agricultural University Baoding 071001¹,

Original Seed Farm of Weichang County of Chengde Chengde 067000²)

Abstract: This paper dealt with the influences of different media, temperature, light and pH to the amount of oospore formation. The results showed that millet agar, bai yun bean agar and soybean agar provided the favorable condition for oospore formation, the number of oospores was 131.6~149.6 /cm², but a few oospores was formation on frozen pea agar. The results also suggested that the optimal conditions for oospore formation were 18℃, pH7 and darkness. The oospores failed to be formed under fluorescent or black light.

Key words: *Phytophthora infestans*, Oospores, Cultural condition

马铃薯是世界上重要的粮食作物之一, 马铃薯晚疫病菌 (*Phytophthora infestans*) 是马铃薯的毁灭性病害, 据国际马铃薯中心 (CIP) 最新统计, 发展中国家每年因晚疫病损失 53 亿美元, 我国每年损失 10 亿美元 (不包括农药费用)^[2]。据国外报道马铃薯晚疫病近年来在世界各地的再度严重流行与晚疫病菌 A2 交配型的产生和迁移有关^[3,4]。有性生殖产生的卵孢子抗

逆能力非常强, 它可以在土壤和马铃薯残体内越冬, 为病害流行提供新的越冬菌源, 并且病菌进行有性生殖后容易发生变异, 使生理小种组成发生变化。经本课题组 1993~1998 年的调查发现, 在我国河北、内蒙、山西、云南及四川等

* 河北省自然科学基金资助项目

收稿日期: 1999-09-06, 修回日期: 1999-11-10

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

马铃薯主产区普遍存在 A1 和 A2 交配型,也能通过有性生殖产生大量卵孢子。鉴于我国马铃薯主产区已普遍存在 A2 交配型,本文初步研究了卵孢子的生物学特性,明确了卵孢子在离体情况下产生的最适条件,为今后研究确定卵孢子病害流行中的地位和作用打下一定基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

供试马铃薯晚疫病菌株 6 个均由河北农业大学马铃薯晚疫病研究组提供。其中 R5、R43 采自河北省康保县;4-3、5-5、3-2 采自河北省围场县;47-5 采自内蒙乌蒙农科所。

1.2 供试培养基

试验共选用 4 种培养基,培养基的成分及制作方法见表 1。

表1 试验用培养基的种类及制作方法

培养基名称	制作方法
白云豆培养基	白云豆粉60g, 50℃~60℃水浴1~2h, 过滤后加V8蔬菜汁100mL, 1.4g CaCO ₃ , 琼脂15g, 加蒸馏水至1000mL, 灭菌。
冰冻豌豆培养基	60g冰冻豌豆, 加1000mL蒸馏水灭菌15min, 过滤后加V8蔬菜汁100mL, 琼脂15g, 加水至1000mL, 灭菌。
大豆培养基	60g大豆粉, 50~60℃水浴1~2h, 过滤后加V8蔬菜汁100mL, 1.4g CaCO ₃ , 琼脂15g, 加水至1000mL, 灭菌。
小米培养基	将60g小米煮沸20min, 过滤, 加V8蔬菜汁100mL, 琼脂15g, 加水至1000mL, 灭菌。

1.3 不同培养基成份对卵孢子产生的影响

采用前述 4 种培养基, 选择 5 对交配效率较高的菌株接种在不同的培养基上, 每对重复 4 次, 在 18℃ 黑暗培养 15~20d, 检查卵孢子产生的数量, 记录卵孢子的大小、颜色及形态。

1.4 不同 pH 值对卵孢子产生的影响

试验采用白云豆培养基。设 pH4、5、6、7、8、9、10、11 共 8 个 pH 值处理, 每处理利用 5 对菌株, 每对菌株重复 4 次, 18℃ 黑暗培养 15~25d, 检查、记录的项目同 1.3。

1.5 不同温度对卵孢子产生的影响

试验采用白云豆培养基。设 10℃、15℃、

18℃、21℃、25℃ 和 30℃ 6 个温度处理, 每处理利用 5 对菌株, 每对菌株重复 4 次, 黑暗培养 15~25d, 检查、记录的项目同 1.3。

1.6 不同光照条件对卵孢子产生的影响

试验采用白云豆培养基。日光灯光照 12h 与黑暗 12h 交替培养, 近紫外光光照 12h 与黑暗 12h 交替培养两个处理, 以全黑暗培养做对照。每处理利用 5 对菌株, 每对菌株重复 4 次, 18℃ 黑暗培养 15~20d, 检查、记录的项目同 1.3。

2 结果与分析

2.1 不同培养基成分对卵孢子产生的影响

试验结果表明, 供试的 4 种培养基中, 晚疫病菌在冰冻豌豆培养基上长势最好, 菌丝生长快且茂密, 其次为大豆粉和白云豆培养基, 在小米培养基上长势较慢, 但培养 20d 后两菌落可相接并产生卵孢子。检查各对菌株产生卵孢子的数量发现, 小米培养基、大豆培养基、白云豆培养基比较适合卵孢子的产生, 产生卵孢子的数量为 131.6~149.6 个/cm², 3 种培养基无显著差异, 但冰冻豌豆培养基不适合卵孢子的产生, 产生卵孢子的数量仅为 5.8 个/cm²。在冰冻豌豆培养基上产生的卵孢子明显少于其它培养基, 说明冰冻豌豆培养基适合无性繁殖但不适合有性生殖。从结果中也可以看出, 同一对菌株在不同培养基上表现不同, 如 R5x4-3、R5x5-5 在小米培养基上产生的卵孢子数量明显高于在大豆和白云豆培养基上产生的数量。

培养基成份除影响卵孢子的数量外, 还对卵孢子的大小、颜色有影响, 在白云豆和大豆培养基上卵孢子为桔黄色, 大小为 29.3~46.8×28.2~46.3μm, 在小米培养基上卵孢子为浅黄色, 大小为 20.4~39.0×20.2~38.5μm。而 Gallegly^[5]报道在小米培养基上产生的卵孢子为红棕色, 大小为 31.5~52.5μm, 与本试验结果有明显不同, 这可能与所选用的试验材料有关。

2.2 pH 值对卵孢子产生的影响

由表 3 可看出 pH 为 7 时, 最合卵孢子的

表2 培养基成份对卵孢子产生数量的影响

培养基	卵孢子数量(个/cm ²)					平均
	R5x3-2	R5x4-3	R5x5-5	R5x47-5	R5xR43	
冰冻豌豆培养基	2.4b	1.5c	1.5c	1.2c	22.3b	5.8b
大豆培养基	43.2a	5.6b	10.9b	13.1b	590.0a	132.6a
小米培养基	45.8a	30.0a	43.5a	23.8b	605.0a	149.6a
白云豆培养基	45.2a	7.3b	11.0b	14.5b	580.0a	131.6a

注: a, b, c表示在 $p=0.05$ 水平上各对菌株在不同培养基上产生卵孢子数量的差异显著性

表3 不同pH值对卵孢子产生数量的影响

pH	卵孢子数量(个/cm ²)					平均
	R5x3-2	R5x4-3	R5x5-5	R5x47-5	R5xR43	
5	0.0c	0.0c	0.9c	1.7c	160.0b	32.5b
6	3.8b	2.5b	5.8b	4.0b	688.0a	140.8a
7	21.0a	14.0a	14.1a	12.5a	867.0a	185.7a
8	3.2b	3.6b	2.7b	6.7b	30.7c	9.4c
9	0.0c	0.9c	0.0c	3.1b	8.1d	2.4d
10	0.0c	0.0c	0.0c	1.2c	3.5d	0.9d

注: a, b, c表示在 $p=0.05$ 水平上各对菌株在不同培养基上产生卵孢子数量的差异显著性

产生, 各对菌株产生的卵孢子数最多, 其中 R5xR43 产生卵孢子的能力最强, 为 867 个/cm², pH 值为 6 和 8 时有 4 对菌株产生卵孢子的数量明显减少, 但 R5xR43 在 pH 为 6 和 pH 为 7 时产生的卵孢子数量无显著差异, 而 pH 为 8 时该对菌株产生的卵孢子数量明显减少。pH 为 5 和 10 时 5 对菌株中分别有 2 对菌株 (R5x3-2 和 R5x4-3) 和 3 对菌株 (R5x3-2、R5x4-3 和 R5x5-5) 都不能产生卵孢子, 说明强酸或强碱环境对卵孢子产生不利, 但也有两对菌株 R5x47-5 和 R5xR43 可以产生一定数量的卵孢子, 以上结果也说明不同菌株对酸碱的耐受能力有一定差异。pH 值对卵孢子的大小和颜色没有明显影响, 卵孢子均为桔黄色, 大小为

28.2~47.2×27.3~46.2μm。在试验过程中发现, 在 pH4 和 pH11 的培养基上菌丝几乎不能生长, 当然也不能产生卵孢子; 在 pH = 5~10 之间, 卵孢子产生数量有明显差异。

2.3 温度对卵孢子产生的影响

由表 4 可知, 马铃薯晚疫病病菌的卵孢子产生的最适温度为 18℃, 且在 15~25℃ 下均能产生卵孢子。但不同菌株产生卵孢子对温度要求也有一定差异, 如 R5x3-2、R5x4-3、R5x5-5 在 15℃ 和 18℃ 时产生的卵孢子数量无明显差异, 而 R5xR43 和 R5x47-5 在 15℃ 和 18℃ 时产生的卵孢子数量则有明显差异。同时在培养过程中发现, 在 10℃ 条件下菌丝生长非常慢, 接种 20d 后菌落直径只有 0.5~0.8cm, 30℃ 时菌丝则停

表4 不同温度对卵孢子产生数量的影响

温度(℃)	卵孢子数量(个/cm ²)					平均
	R5x3-2	R5x4-3	R5x5-5	R5x47-5	R5xR43	
15	10.8a	12.8a	8.3a	9.9b	269.0b	62.2b
18	13.1a	14.1a	11.1a	14.8a	635.0a	137.6a
21	0.8b	4.0b	1.7b	1.3c	10.6c	3.7c
25	0.5b	5.0b	1.5b	1.4c	10.2c	3.7c

注: a, b, c表示在 $p=0.05$ 水平上各对菌株在不同培养基上产生卵孢子数量的差异显著性

止生长, 15~18℃最适合菌丝生长, 培养10d后菌落直径可达8cm。培养25d检查结果发现, 18℃下各对交配型产生的孢子最多, 为137.6个/cm², 21℃和25℃对菌丝生长和孢子产生均不利, 25d后产生孢子数为3.7个/cm², 明显少于15℃和18℃下产生孢子的数量。温度对孢子的大小及颜色基本没有影响, 不同温度下孢子的颜色均为桔黄色, 大小为

28.5~46.8×27.5~45.5μm。

2.4 光照条件对孢子产生的影响

试验结果表明, 在有光存在的情况下, 菌丝生长缓慢, 且不能产生孢子。用日光灯和近紫外光处理的试验, 培养20~25d两菌落才能相接, 而黑暗培养的菌落培养10d后两菌落即可相接, 并产生孢子。说明日光和近紫外光不仅抑制孢子的产生, 对菌丝生长速度也有

表5 不同光照条件对孢子产生数量的影响

光照处理	孢子数量(个/cm ²)					平均
	R5x3-2	R5x4-3	R5x5-5	R5x47-5	R5xR43	
24h黑暗	13.1	14.1	11.3	14.8	635.0	137.7
12h日光/12h黑暗	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
12h近紫外光/12h黑暗	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

一定抑制作用。

综合以上结果发现, 培养条件对马铃薯晚疫病病菌孢子的产生有很大影响。试验结果表明, 孢子产生最有利的条件为: 白云豆(大豆或小米)培养基、温度18℃、pH为7, 黑暗培养。

3 讨论

马铃薯晚疫病病菌的孢子能否在土壤中越冬作为该病的初侵染来源至今在国内还没有明确报道, 主要原因是没有成熟的培养和纯化孢子的方法, 阻碍了该项研究的进展, 本文首次报道了孢子产生的最适条件为白云豆(大豆或小米)培养基、pH7、温度为18℃和黑暗培养。该研究结果为今后研究孢子在马铃薯晚疫病流行中的地位 and 作用, 为进一步制定有效的防治措施打下了一定理论基础。

本文研究发现不同培养基的成份对孢子的颜色、大小也有影响, 在小米培养基上产生的孢子直径大多数为20μm左右, 颜色浅黄色,

比其它培养基上产生的孢子小, Gallegly^[5](1958)报道晚疫病病菌在小米培养基上产生的孢子大小为31.5~52.5μm, 且颜色为红棕色或桔褐色, 与本文的试验结果有明显的不同之处。这可能与试验所选用的菌株的性质及所用的试验材料有关, 究竟什么原因需要进一步试验研究。

参 考 文 献

- [1] Zhang Z. M., Li Y., Tian S. M., et al. Journal of Agricultural University of Hebei, 1996, 19(4): 65~69.
- [2] 宋伯符, 王军. 中国马铃薯晚疫病防治研讨会论文集, 1996, 3~6.
- [3] Andre Drenth, Lodewijk J. Turkensteen, et al. Netherlands Journal of Plant Pathology, 1993, 99, supplement 3: 57~67.
- [4] Spielman L. J., Drenth A., Davidse L. C., et al. Plant Pathology, 1991, 40: 422~430.
- [5] Gallegly M. E., Galindo J. Phytopathology, 1958, 48: 274~277.