

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2020)05-0290-07

高温胁迫对内蒙古自治区和云南省致病疫霉 生长及产孢的影响

王 冰, 常婧一, 白家琪, 晋伊美, 杨志辉, 赵冬梅*

(河北农业大学植物保护学院, 河北 保定 071001)

摘 要: 由致病疫霉[*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary]引起的马铃薯晚疫病是马铃薯生产上的重要病害, 而温度是决定马铃薯晚疫病是否发生及发生程度的重要因素。为了明确不同温度及同一温度不同时间的胁迫处理对致病疫霉生长及产孢能力的影响, 以18℃恒温培养作为对照, 对采集自内蒙古自治区和云南两个地区的致病疫霉进行不同时间的高温胁迫处理。待菌株在18℃培养至三分之一皿时, 每天在30, 35和40℃分别进行3, 6和9 h的变温处理, 连续处理4 d, 变温处理后的菌株继续18℃培养, 直至对照菌株长满整个培养皿。结果表明, 随着胁迫时间的延长和温度的升高, 致病疫霉的生长受到不同程度的抑制。其中, 内蒙古自治区菌株NY13-12受到的抑制最为明显, 在30, 35和40℃高温处理9 h时, 菌落直径较对照分别减少28.74%、37.13%和53.89%。高温胁迫对致病疫霉的产孢具有不同的影响, 30和35℃处理对致病疫霉的产孢量有刺激作用, 但40℃处理对产孢有抑制作用。其中, 菌株NY13-8在30℃处理9 h后, 单位面积产孢量为1 280个/mm², 是对照的11.85倍, 但40℃处理3 h后单位面积产孢量较对照减少37.04%。研究结果为晚疫病预测预报模型的构建及完善提供了数据支持。

关键词: 致病疫霉; 晚疫病; 温度; 产孢

Effects of High Temperature Treatment on Growth and Sporulation of *Phytophthora infestans* in Inner Mongolia and Yunnan

WANG Bing, CHANG Jingyi, BAI Jiaqi, JIN Yimei, YANG Zhihui, ZHAO Dongmei*

(College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001, China)

Abstract: Potato late blight caused by *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary is an important disease in potato production. Temperature is an important factor to determine the occurrence and degree of the potato late blight. In order to find out the effect of different temperature and time treatments on the growth and sporulation of *P. infestans*, the isolates collected from Yunnan and Inner Mongolia were treated with high temperatures for different times using culture at 18℃ as a control. When the isolates were cultured to one-third of the petri dish at 18℃, isolates were treated at 30, 35 and 40℃ for 3, 6 and 9 h respectively each day and the treatments were repeated for 4 d. After high temperature treatment, the isolates continued to be cultured at 18℃ until the control covered the whole plate. The growth of *P. infestans* was inhibited to some extent with the increase of treatment time and temperature. The growth of NY13-12 which was collected from Inner Mongolia was inhibited most under different temperatures and times. After the

收稿日期: 2020-01-09

基金项目: 河北省教育厅青年基金(QN2019156); 河北省薯类产业技术体系创新团队专项基金(HBCT2018080205)。

作者简介: 王冰(1999-), 女, 本科生, 研究方向为植物保护。

*通信作者(Corresponding author): 赵冬梅, 博士, 讲师, 研究方向为马铃薯病害, E-mail: zhaodongm03@126.com。

isolate NY13-12 was treated at 30, 35 and 40℃ for 9 h, the colony diameter decreased by 28.74%, 37.13% and 53.89% compared with the control, respectively. It was also found that the sporulation capacity of *P. infestans* was stimulated at 30 and 35℃, but inhibited at 40℃. After treated at 30℃ for 9 h, the sporulation capacity per unit area of NY13-8 reached 1 280 spores/mm², which was 11.85 times that of the control. However, the sporulation capacity per unit area of NY13-8 was 37.04% lower than that of the control at 40℃ treated for 3 h. The results provide data supports for the construction and improvement of the prediction model of the late blight.

Key Words: *Phytophthora infestans*; late blight; temperature; sporulation

马铃薯是世界上继水稻、小麦和玉米之后的第四大粮食作物。2015年,中国马铃薯主粮化战略启动,预计在2020年50%以上的马铃薯将作为主粮消费。同时,中国马铃薯主产区与中国贫困区分布高度重合,马铃薯产业在当前中国产业扶贫中发挥着重要作用。由致病疫霉 [*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary]引起的马铃薯晚疫病是马铃薯生产中最具毁灭性的病害之一^[1],一般年份减产20%左右,严重时减产50%以上,甚至绝收^[2]。

病原菌、寄主以及环境三个因素构成了病害发生和流行的必要条件,其中温度是环境因素中的主要因素。温度对病原菌的生长和繁殖有一定的影响。不同的病原菌对温度的适应性不同,同一种病原菌不同个体对温度的反应也不相同。Peduto等^[3]指出白粉病在21~30℃时流行,高温可以阻碍白粉病菌生长和产孢,36~38℃开始致死,致死时间随着温度的升高而减小。周晓榕等^[4]研究了温度对蜡蚧轮枝菌菌丝生长和产孢量的影响,发现该菌的生长范围为10~33℃,适宜菌丝生长的温度为15~28℃,最适温度为18~25℃;10~30℃均可产生分生孢子,产孢适宜温度为15~30℃,25℃下产孢量最高,12和15℃时产孢量较低。董贤慧等^[5]研究了温度对茄病镰刀菌生长情况及产孢量的影响,表明茄病镰刀菌的生长范围为20~37℃,30℃最适合茄病镰刀菌菌落生长,随着温度的升高或降低,菌落生长速度逐渐减慢。Tooley和Browning^[6]研究了温度对橡树疫霉产孢的影响,发现橡树疫霉在20℃产孢量最大,在15℃时,24 h即可产生孢子囊,在10和20℃需要48 h产生孢子囊,然而在4, 25和30℃时,3 d后才能产生孢子囊。

马铃薯晚疫病是典型的气传病害,其流行与温湿度等环境条件密切相关^[7],且其生活史中的重要阶

段都会受到温湿度的影响^[8]。温度能够显著地影响菌丝生长、孢子形成和菌株的存活^[9]。在致病疫霉最适生长温度的研究中发现,13~25℃内,19℃时病原菌的生长率最高,随着温度的升高或降低,生长率逐渐减小,不同地区的致病疫霉温度适应性不同^[10]。Crosier^[11]研究发现产生孢子囊的适宜温度是21℃,但是在3~26℃也均能观察到孢子囊形成。Harrison^[12]指出,孢子囊产生的适宜温度是19~22℃,当温度高于26℃或低于8.5℃时便不再产生孢子囊。当温度高于12℃时,孢子囊直接萌发产生芽管,温度低于12℃时形成游动孢子感染寄主^[13]。贾京珠^[14]发现,在15~27℃,18和22℃为致病疫霉的最适生长温度,生长率间无显著差异,与最适生长温度18℃相比,致病疫霉生长率在15和25℃表现出显著差异,27℃时生长率有极显著差异,致病疫霉在18℃时产孢量最大。

本研究通过明确不同时间高温胁迫对致病疫霉生长及产孢能力的影响,以为晚疫病预测预报模型的构建及完善提供数据支撑,为病害防控策略制定提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

研究选取了本实验室采集自内蒙古自治区的3株和云南省的1株致病疫霉菌株作为供试菌株。菌株具体信息见表1。

1.2 高温胁迫下致病疫霉生长速率的测定

以18℃恒温培养为对照,待菌落生长至培养皿三分之一时,每天对被测菌株进行30, 35和40℃高温胁迫处理3, 6和9 h,连续处理4 d,再在恒温18℃下培养,待对照菌落生长至培养皿近满皿时,进行菌落直径测定,分析不同时间的高温胁迫对致

表1 菌株信息
Table 1 Information of strain

菌株编号 Isolate number	采集地点 Collection location	采集年份 Collection year
NY13-8	内蒙古	2016
NY13-12	内蒙古	2016
NY15-4	内蒙古	2015
DX16-64	云南	2016

病疫霉生长的影响。每个处理重复3皿, 共进行3次生物学重复。

1.3 高温胁迫下致病疫霉产孢量的测定

以18℃恒温培养为对照, 待菌落生长至培养皿三分之一时, 每天对被测菌株进行30, 35和40℃高温胁迫处理3, 6和9 h, 连续处理4 d, 再在恒温18℃下培养, 待对照菌落生长至培养皿近满皿时, 测量菌株在不同处理下的产孢量。用移液枪在培养皿中各加5 mL ddH₂O, 制成孢悬液。每皿观察3次, 统计1 μL孢悬液中孢子囊的个数。利用单位面积产孢量这一相对指标来测定温度对致病疫霉产孢能力的影响, 以排除致病疫霉菌落直径与产孢量之间的相互影响。每个处理重复3皿, 共进行3次生物学重复。

单位面积产孢量(个/mm²) = 每皿的产孢量/菌落面积

2 结果与分析

2.1 高温胁迫对致病疫霉生长速率的影响

2.1.1 温度对内蒙古自治区致病疫霉菌落生长的影响

采集自内蒙古自治区的3个菌株在不同温度及不同时间处理下菌落直径的变化趋势一致。在同一处理时间下, 随着温度的升高, 菌落生长受抑制的程度也随之增加。在同一温度下, 随着处理时间的增加, 菌落生长受抑制的程度也随之增加, 但抑制程度小于温度对菌落生长的抑制。在采集自内蒙古自治区的3个菌株中, NY13-12在不同温度及时间的处理下受到的抑制最为明显(图1)。菌株NY13-12每天进行3 h胁迫, 与对照相比, 随着处理温度的升高, 菌落直径减小。对照菌株生长直径为83.5 mm, 而30, 35和40℃3个不同温度胁迫处理

下, 其菌落直径分别为74.5, 71.0和60.5 mm, 与对照相比, 菌落直径减少了10.78%, 14.97%, 27.54%; 而随处理时间的延长, 供试菌株的生长被明显抑制(图2), 在30, 35和40℃高温处理6 h时, 其菌落直径分别为63.0, 56.5和40.5 mm, 与对照相比, 菌落直径减少了24.55%, 32.34%和51.50%; 在30, 35和40℃高温处理9 h菌落直径分别为59.5, 52.5和38.5 mm, 与对照相比, 菌落直径减少了28.74%, 37.13%和53.89%。

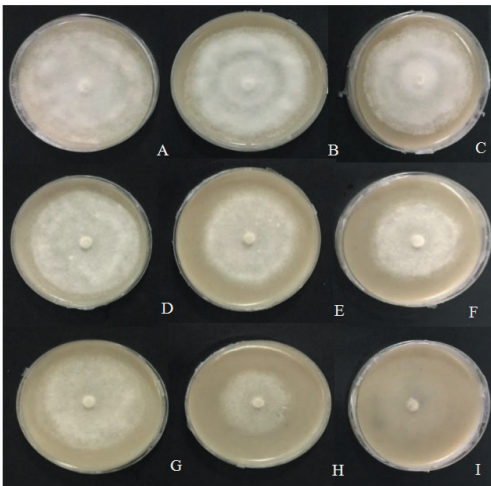
2.1.2 温度对云南省致病疫霉菌落生长的影响

利用3个不同高温对菌株每天进行3 h胁迫, 与对照相比, 供试菌株菌落生长并未有大的变化(图3), 对照菌株生长直径为85.0 mm, 而30, 35和40℃3个不同温度胁迫处理下, 其菌落直径分别为77.5, 76.0和67.5 mm, 与对照相比, 菌落直径减少了8.82%, 10.59%, 20.59%; 而随处理时间的延长, 供试菌株的生长被显著抑制(图3), 在30, 35和40℃高温处理6 h时, 其菌落直径分别为76.0, 69.5和60.0 mm, 与对照相比, 菌落直径减少了10.59%, 18.24%, 29.41%; 而处理9 h菌落直径分别为71.3, 66.5和54.0 mm, 与对照相比, 菌落直径减少了16.18%, 21.76%和36.47%。

2.2 高温胁迫对致病疫霉单位面积产孢量的影响

2.2.1 温度对内蒙古自治区致病疫霉单位面积产孢量的影响

利用30, 35和40℃的高温对采集自内蒙古自治区的致病疫霉菌株每天进行3, 6和9 h的高温胁迫, 与对照相比, 采集自内蒙古自治区的各菌株在30和35℃的高温胁迫下, 单位面积产孢量有明显增加(图4)。其中, NY13-8对照处理单位面积产孢量为108个/mm², 在30℃9 h的高温胁迫下, 单位面积

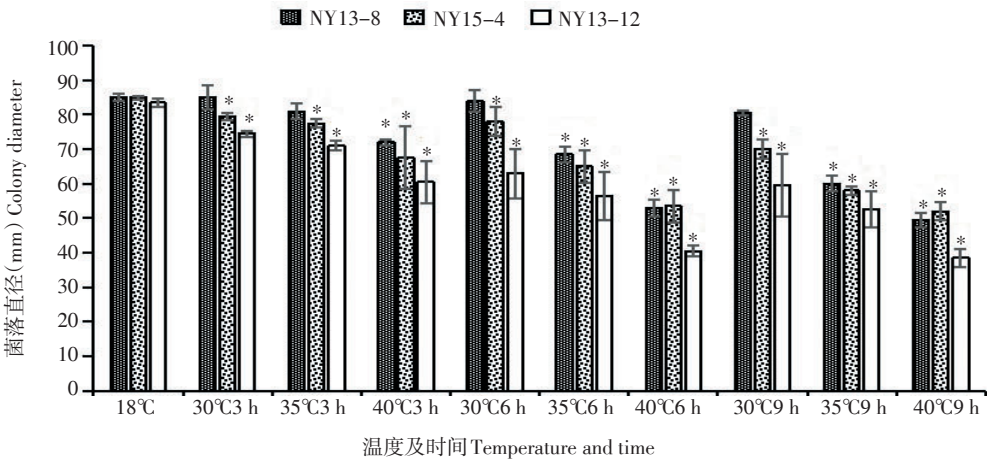


A: 供试菌株 30℃处理 3 h 的菌落直径; B: 供试菌株 30℃处理 6 h 的菌落直径; C: 供试菌株 30℃处理 9 h 的菌落直径; D: 供试菌株 35℃处理 3 h 的菌落直径; E: 供试菌株 35℃处理 6 h 的菌落直径; F: 供试菌株 35℃处理 9 h 的菌落直径; G: 供试菌株 40℃处理 3 h 的菌落直径; H: 供试菌株 40℃处理 6 h 的菌落直径; I: 供试菌株 40℃处理 9 h 的菌落直径。

A: Colony diameter of *P. infestans* treated at 30℃ for three hours; B: Colony diameter of *P. infestans* treated at 30℃ for six hours; C: Colony diameter of *P. infestans* treated at 30℃ for nine hours; D: Colony diameter of *P. infestans* treated at 35℃ for three hours; E: Colony diameter of *P. infestans* treated at 35℃ for six hours; F: Colony diameter of *P. infestans* treated at 35℃ for nine hours; G: Colony diameter of *P. infestans* treated at 40℃ for three hours; H: Colony diameter of *P. infestans* treated at 40℃ for six hours; and I: Colony diameter of *P. infestans* treated at 40℃ for nine hours.

图 1 不同温度和时间处理下致病疫霉(NY13-12)菌落直径

Figure 1 Colony diameter of *Phytophthora infestans* (NY13-12) under different temperatures and times



误差线是标准差; 星号表示差异显著 ($P < 0.05$)。下同。
Error bar is standard deviation; asterisk indicate significant difference ($P < 0.05$). The same below.

图 2 不同温度和时间处理对采集自内蒙古自治区致病疫霉(NY13-8、NY15-4和NY13-12)生长的影响
Figure 2 Effects of different temperatures and times on growth of *Phytophthora infestans* isolates (NY13-8, NY15-4 and NY13-12) collected in Inner Mongolia Autonomous Region

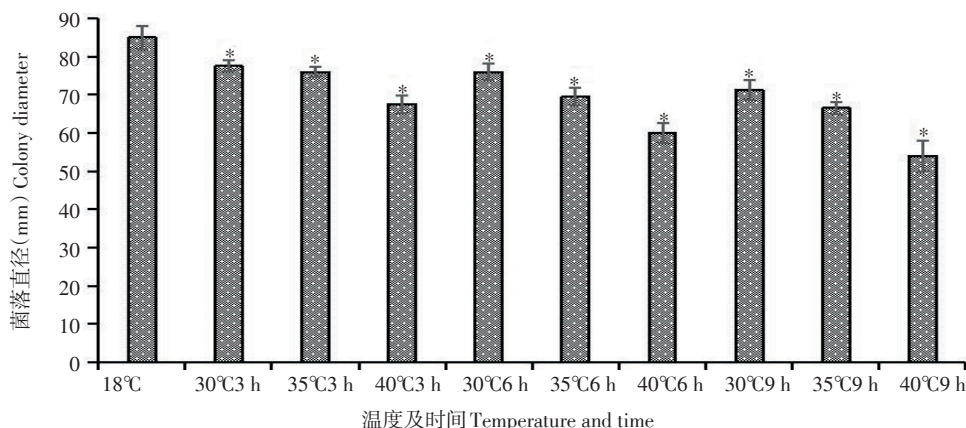


图3 不同温度和时间处理对采集自云南省致病疫霉(DX16-64)生长的影响

Figure 3 Effects of different temperatures and times on growth of *Phytophthora infestans* isolate (DX16-64) collected in Yunnan Province

产孢量达到了最大值, 为1 280个/mm², 是对照的11.85倍。NY15-4对照处理的单位面积产孢量为63个/mm², 在35°C 3 h的高温胁迫下, NY15-4单位面积产孢量达到了364个/mm², 是对照的5.78倍。菌株NY13-12在18°C恒温培养下, 单位面积产孢量为1个/mm², 在30°C 9 h的高温胁迫下, 单位面积产孢达到了125个/mm², 是对照的125倍。当胁迫温度达到40°C时, 每个菌株的产孢均受到了抑制, 单位面积产孢量减少(图4)。菌株NY13-8在40°C 3 h的高温处理下, 单位面积产孢量为61个/mm², 与对照

相比减少了43.52%; 菌株NY15-4在40°C 3 h的单位面积产孢量为69个/mm², 与对照相比减少了1.43%; 菌株NY13-12在40°C 3 h的单位面积产孢量为0.8个/mm², 与对照相比减少了20.00%。均低于18°C恒温处理下各菌株的单位面积产孢量。

2.2.2 温度对云南省致病疫霉单位面积产孢量的影响

利用30, 35和40°C高温对采集自云南省的致病疫霉菌株每天进行3, 6和9 h的高温胁迫。与18°C恒温处理相比, 菌株DX16-64在30和35°C的高温处理下菌株的产孢量都有一定的升高, 而且35°C的高

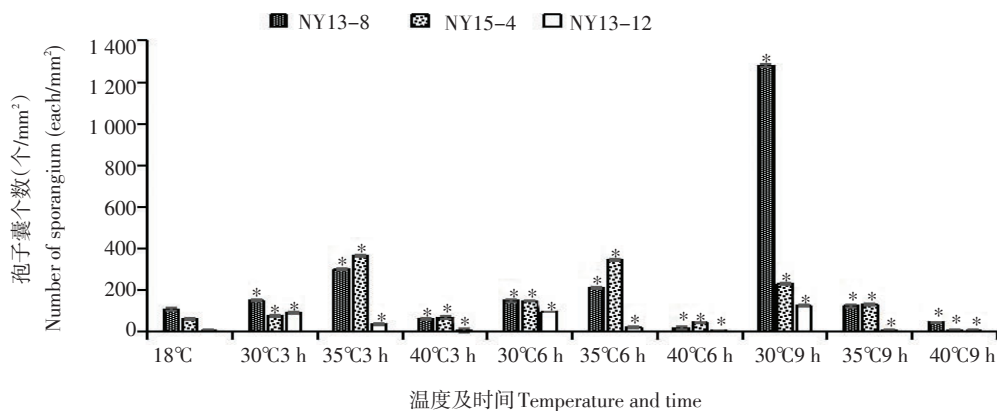


图4 不同温度和时间处理对采集自内蒙古自治区致病疫霉(NY13-8、NY15-4和NY13-12)产孢的影响

Figure 4 Effects of different temperatures and times on sporulation of *Phytophthora infestans* isolates (NY13-8, NY15-4 and NY13-12) collected in Inner Mongolia Autonomous Region

温处理后对菌株产孢的刺激作用更大, 单位面积的产孢量增加的更多(图5)。对照菌株的单位面积产孢量为59个/mm², 随着温度的升高在35℃ 3 h有明显的数值变化为175个/mm², 是对照的2.97倍。但

40℃的高温胁迫对菌株的产孢有明显的抑制作用, 单位面积产孢量下降(图5)。DX16-64菌株在40℃ 3 h的单位面积产孢量为46个/mm², 与对照恒温处理相比, 降低了22.03%。

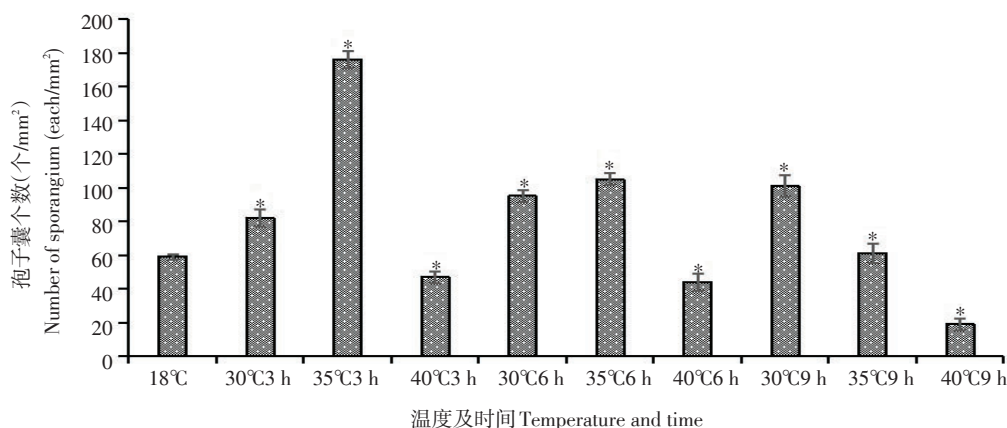


图5 不同温度和时间处理对采集自云南省致病疫霉(DX16-64)产孢的影响

Figure 5 Effects of different temperatures and times on sporulation of *Phytophthora infestans* isolate (DX16-64) collected in Yunnan Province

3 讨 论

温度对病原菌生长、繁殖和致病力都有很大的影响。了解致病疫霉的温度适应性的规律和特点, 对深入认识该菌的温度适应性演化和分子机理、指导晚疫病的测报和病害防控策略的制定具有重大意义。

致病疫霉群体在温度范围内各指标呈现一定的变化趋势, 但其个体对温度的适应性却有很大的差异^[15]。致病疫霉是典型的低温适应性病原菌, 病菌生长和繁殖最适合的温度为15~22℃^[10]。Chapman^[16]评估了致病疫霉在5, 10, 15, 20, 25和30℃下生长和产孢情况, 发现20℃致病疫霉生长最快, 5和25℃时生长率低, 30℃时致病疫霉几乎不生长。在本研究中发现30、35以及40℃下进行不同时间的高温胁迫均会抑制致病疫霉的生长, 随着温度的升高以及处理时间的延长, 抑制作用也会随之增强, 但并不完全抑制其生长。这与Chapman^[16]发现30℃时致病疫霉几乎不生长的实验结果有差异, 一方面, 本研究中的高温处理属于短时间的处理, 在阶段性

的高温处理后恢复至适温培养, 这样更加接近自然界中病原菌所处的环境; 另一方面, 推测可能由于全球的气温升高, 病原菌对于高温也具有了更强的适应性。同时, 在本研究中发现采集自内蒙古自治区和云南地区的致病疫霉在不同温度及时间的处理下, 虽然菌落生长的变化趋势相同, 但不同菌株受到的抑制程度不同, 表明了不同菌株间对温度的适应性不同。其中采集自内蒙古自治区的菌株NY13-12在不同温度及时间的处理下受到的抑制最为显著, 40℃高温处理9 h, 菌落仅为38.5 mm。而采集自云南省的菌株在40℃高温处理9 h, 菌落直径仍可达54.0 mm。说明相对于采集自内蒙古自治区的菌株而言, 采集自云南省的菌株对温度有更强的适应性。温度的适应典型的表现是在温度升高时生长率增加到一个峰值后, 继续增加温度则生长率降低, 适应性下降^[17]。

变温处理不仅对致病疫霉的生长具有一定的作用, 同时对产孢也有一定的影响。Miller和Johnson^[18]对致病疫霉分别在18, 23和28℃下进行培养, 发现在18和23℃几乎无差异, 而在28℃时几乎不产孢。

但在本研究中发现各供试菌株在30和35℃的变温处理下对菌落的产孢量有刺激作用,在40℃的变温处理下对菌株的产孢有抑制作用。而且,采集自相同或不同地区的致病疫霉群体单位面积产孢量趋势不同,其中,采集自内蒙古自治区的3个致病疫霉菌株中,NY13-8和NY13-12在30℃9 h的高温胁迫下,单位面积的产孢量最大,而菌株NY15-4在35℃3 h的高温胁迫下产孢量最大,说明同一地区不同个体间对温度的适应性差异很大。同样,采集自云南省的菌株DX16-64在30和35℃的高温处理下菌株的产孢量都有一定的升高,而且35℃的高温处理后对菌株产孢的刺激作用更大,但是产孢量上升的倍数远远小于采集自内蒙古自治区的菌株,云南省的年平均温度高于内蒙古自治区,因此菌株对高温的适应性强于内蒙古自治区的菌株。说明物种若想生长、繁殖及进化,必须适应环境,所以物种会通过遗传分化而形成不同的温度适应性以保证物种的繁衍^[19]。

[参 考 文 献]

- [1] 王腾, 马爽, 孙继英, 等. 中国马铃薯晚疫病病菌生理小种研究进展 [J]. 中国马铃薯, 2017, 31(1): 45-53.
- [2] Hooker W J. Compendium of potato diseases [M]. St. Paul, MN, USA: American Phytopathological Society, 1981.
- [3] Peduto F, Backup P, Hand E K, et al. Effect of high temperature and exposure time on *Erysiphe necator* growth and reproduction: revisions to the UC Davis powdery mildew risk index [J]. Plant Disease, 2013, 97(11): 1438-1447.
- [4] 周晓榕, 高翔, 王新乐, 等. 温度对蜡蚧轮枝菌菌丝生长、产孢量及致病力的影响 [J]. 内蒙古农业大学学报: 自然科学版, 2005, 26(4): 36-38.
- [5] 董贤慧, 钱涛, 高维娟, 等. 温度对茄病镰刀菌生长情况及产孢量的影响 [J]. 中国真菌学杂志, 2011, 6(1): 22-25.
- [6] Tooley P W, Browning M. Temperature effects on the onset of sporulation by *Phytophthora ramorum* on *Rhododendron* 'Cunningham's White' [J]. Journal of Phytopathology, 2015, 163 (11-12): 908-914.
- [7] Hartill W, Young K, Allan D J, et al. Effects of temperature and leaf wetness on the potato late blight [J]. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 1990, 18(4): 181-184.
- [8] Duniway J M. Role of physical factors in the development of *Phytophthora* diseases [J]. Ice Transactions on Electronics, 2005, 88(5): 1824-1831.
- [9] Sato N. Effect of sporulating temperature on the limit temperature of indirect germination of the sporangia of *Phytophthora infestans* [J]. Annals of the Phytopathological Society of Japan, 1994, 60(1): 60-65.
- [10] 杨策. 中国马铃薯晚疫病菌线粒体单倍型与温度适应性分析 [D]. 福州: 福建农林大学, 2013.
- [11] Crosier W F. Studies in the biology of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary [M]. Ithaca NY, USA: Cornell University, 1934.
- [12] Harrison J G. Effects of the aerial environment on late blight of potato foliage [J]. Plant Pathology, 1992, 41(4): 384-416.
- [13] Latijnhouwers M, Ligterink W, Vleeshouwers V G, et al. A Galpha subunit controls zoospore motility and virulence in the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans* [J]. Molecular Microbiology, 2004, 51(4): 925-936.
- [14] 贾京珠. 2013-2014年东北和华北地区致病疫霉群体遗传多样性及生物学特性的研究 [D]. 保定: 河北农业大学, 2015.
- [15] 胡珍珠, 杨志辉, 赵冬梅, 等. 内蒙古和河北致病疫霉温度适应性的研究 [C]//中国植物病理学会2015年学术年会论文集. 北京: 中国农业出版社, 2015: 106.
- [16] Chapman A C. The changing *Phytophthora infestans* population: implications for late blight epidemics and control [D]. Dundee: University of Dundee, 2012.
- [17] Huey R B, Stevenson R D. Integrating thermal physiology and ecology of ectotherms: a discussion of approaches [J]. Integrative and Comparative Biology, 1979, 19(1): 357-366.
- [18] Miller J S, Johnson D A. Aggressiveness of *Phytophthora infestans* genotypes on potato stems and leaves at three temperatures [J]. American Journal of Potato Research, 2014, 91(5): 538-553.
- [19] Day J P, Wattier R, Shaw D S, et al. Phenotypic and genotypic diversity in *Phytophthora infestans* on potato in Great Britain, 1995-98 [J]. Plant Pathology, 2004, 53(3): 303-315.