

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2007)06-0331-03

学术园地

适合马铃薯晚疫病菌生长的培养基改良试验

金光辉^{1,2}, 白雅梅^{1*}, 孙秀梅³, 徐学谱⁴, 吕文河^{1*}

(1. 东北农业大学, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江八一农垦大学, 黑龙江 大庆 163319;

3. 黑龙江省农业科学院马铃薯研究所, 黑龙江 克山 161606; 4. 大兴安岭地区农业科学研究所, 黑龙江 加格达奇 165000)

摘要: 由致病疫霉 *Phytophthora infestans* 引起的晚疫病是全球第一大作物病害, 对马铃薯生产危害非常严重。在对该病菌的研究中确定适宜的培养基是比较关键的一环。本文采用完全随机设计, 将晚疫病菌接种到黑麦与胡萝卜不同混合比例的 5 种培养基上, 通过隔日调查的方法, 比较其菌落生长直径的大小和产孢量的多少, 以此作为衡量 5 种培养基培养效果的指标。研究结果表明: 黑麦与胡萝卜的比例为 1:1 时, 晚疫病菌的菌落生长速度最快, 产孢量最多, 培养效果最好。因此, 可以利用这种培养基来培养马铃薯晚疫病菌, 这对开展晚疫病菌的进一步研究具有一定的实际意义。

关键词: 马铃薯; 晚疫病菌; 培养基

由致病疫霉 *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary 引起的马铃薯晚疫病以其危害性重, 难以防治, 对社会影响巨大, 成为当今世界第一大作物病害^[1]。马铃薯晚疫病菌是一种寄生水平很高的卵菌, 在其生长过程中对氮源、碳源、维生素辅助生长素以及其他营养环境均有其独特的需求^[2]。目前用于繁殖晚疫病菌的方法主要有固体培养基、液体培养基及薯片保存等方法^[3-4]。国际上主要利用 V8 汁、利马豆 (Lima bean) 以及黑麦等制作的培养基来培养晚疫病菌^[5-6]。国内目前主要利用黑麦培养基来培养晚疫病菌, 然而购买适合的黑麦品种也比较困难。姚裕琪等^[7]报道了适合马铃薯晚疫病菌生长的豆类培养基, 认为日本菜豆培养基可以用来代替利马豆繁殖晚疫病菌。本研究在原有的黑麦培养基的基础之上进行了改良。

1 材料与方法

1.1 材料

供试的培养基材料: 黑麦 冬牧 70、胡萝卜 (从

当地市场购买, 品种名未知, 肉色深红色)。晚疫病菌株为 KS04-7, 生理小种类型为 3.4.7.8.9.10.11, A1 交配型。

1.2 方法

1.2.1 试验设计

试验采用单因素完全随机设计, 试验设 5 个处理 (表 1), 每个处理 3 次重复。

表 1 培养基类型及所含的营养成分

处理	培养基类型	培养基制作数量 (mL)	培养基中营养成分比例 (黑麦: 胡萝卜)
M1	黑麦	200	4:0
M2	黑麦+胡萝卜	150+50	3:1
M3	黑麦+胡萝卜	100+100	1:1
M4	黑麦+胡萝卜	50+150	1:3
M5	胡萝卜	200	0:4

1.2.2 培养基的制备及接种

本试验于 1995 年在东北农业大学马铃薯研究室进行。取黑麦 60 g, 放入 100 mL 的三角烧瓶中, 加水 50 mL, 在室温下放置 30~40 h 后, 过滤后放入搅拌机中, 加水适量, 同时保留其滤液。利用搅拌机搅碎后, 将粉碎的黑麦放入 500 mL 的三

收稿日期: 2007-01-04

基金项目: 国家 863 计划 (2002AA207011)

作者简介: 金光辉 (1973-), 男, 博士, 副教授, 主要从事马铃薯抗病育种及晚疫病防治方面的研究。

*通讯作者: E-mail: baiyamei669@163.com; E-mail: whlu@mail.neau.edu.cn

角烧瓶中, 然后放入水浴锅, 50 °C 水浴加热 3 h, 利用 4 层纱布过滤, 取其滤液, 与先前的滤液混合后定容至 1 000 mL, 取 500 mL 备用。

取胡萝卜 200 g, 用搅拌机搅碎后过滤, 滤液加水定容至 1 000 mL, 取滤液 500 mL 备用。根据试验设计将黑麦与胡萝卜滤液按不同比例混合后, 分别装入 200 mL 的三角烧瓶中。所有处理均加琼脂粉 15 g, 蔗糖 15 g, 之后进行高压灭菌。将灭好菌的培养基在无菌操作台上倒在直径为 9 cm 的培养皿中, 薄厚均匀。然后用接菌针挑一小块菌丝, 要求大小均匀一致, 接到培养皿的中央。将接好菌的培养皿放入人工气候箱内, 18 °C 黑暗培养。接菌后第 3 d 开始调查菌落生长情况, 以后每隔 4 d 调查一次, 共调查 3 次, 最后 1 次调查时利用血球计数器同时检测晚疫病菌的产孢量。

1.2.3 统计分析

利用 DPS 数据处理系统软件进行方差分析, 处理平均数的比较采用新复极差法。

2 结果与分析

2.1 不同类型培养基对晚疫病菌菌落生长速度的影响

培养基类型不同, 菌落的生长速度不同。M3 的菌落生长速度最快, 接菌后第 11 d 菌落直径达到了 7.53 cm, 其次为 M4 和 M2, 生长到第 11 d 的菌落直径分别达到 6.50 cm 和 6.43 cm, 再次为 M1, 菌落直径达到 4.40 cm, 而 M5 的菌落生长速度最慢, 第 11 d 的菌落直径仅为 0.23 cm(图 1)。

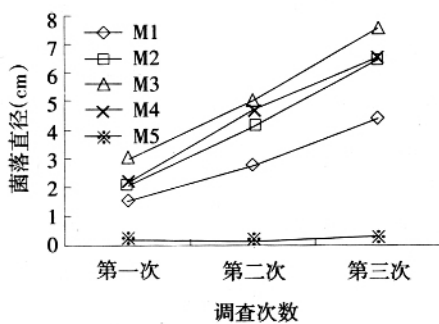


图 1 晚疫病菌在不同培养基上的生长速度

2.2 不同类型培养基对晚疫病菌的培养效果

不同类型培养基对晚疫病菌的菌落生长有着不同的效果, 其中黑麦与胡萝卜混合培养基的培养效

果均好于单纯黑麦 (M1) 和单纯胡萝卜 (M5) 的培养, 尤其是当黑麦与胡萝卜的混合比例为 1:1 时 (M3), 培养效果最好, 菌落生长最为迅速。但是菌落的繁茂性却不如单纯黑麦和胡萝卜培养基 (表 2)。

表 2 培养基类型及所含的营养成分

处 理	培养基类型	接种第 11d 菌落生长直径 (cm)	菌落的疏密程度
M1	黑麦+胡萝卜	7.53 ^A	疏
M2	黑麦+胡萝卜	6.50 ^A	密
M3	黑麦+胡萝卜	6.43 ^{AB}	疏
M4	黑麦	4.40 ^B	密
M5	胡萝卜	0.23 ^C	密

注: 具有不同字母的处理达 1% 的差异显著性(下同)

方差分析和多重比较结果表明: M3、M4 和与 M2 之间菌落生长直径的差异未达到极显著水平, 而与 M1 和 M5 之间达到了极显著水平。M1 与 M2 差异不显著, 但与 M5 之间的差异极显著。以上结果说明, M3 和 M4 黑麦: 胡萝卜成分比例分别为 1:1 和 1:3 可以作为替代黑麦培养基来培养晚疫病菌。

2.3 不同类型培养基对晚疫病菌产孢量的影响

不同类型的培养基对晚疫病菌的孢子囊的产生数量有很大的影响。黑麦和胡萝卜的混合培养基产生孢子囊的数量均多于单纯黑麦和胡萝卜培养基, 而且当黑麦和胡萝卜的混合比例为 1:1 时, 产孢量最高, 达到了 6.2×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ (表 3), 黑麦培养基的产孢量为 2.6×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$, 胡萝卜培养基的产孢量仅为 0.4×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 。这可能与黑麦和胡萝卜混合时, 营养比较全面, 更有利于病原菌产生孢子囊有关。但所有处理, 只有 M3 与 M5 之间差异达到了极显著, 其余处理差异均不显著。

表 3 不同类型培养基对晚疫病菌产孢量的影响

处 理	培养基类型	产孢量 (10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$)
M1	黑麦+胡萝卜	6.2 ^A
M2	黑麦+胡萝卜	4.1 ^{AB}
M3	黑麦+胡萝卜	3.8 ^{AB}
M4	黑麦	2.6 ^{AB}
M5	胡萝卜	0.4 ^B

3 讨 论

当培养基中含有黑麦和胡萝卜两种营养物质时, 晚疫病菌的培养效果均好于单纯黑麦和胡萝卜一种营养物质, 这可能与两种物质的营养成分与单一黑麦或胡萝卜的营养成分相比, 更能够满足晚疫病菌的生长需求有关。胡萝卜培养基主要用来培养大豆疫霉根腐病菌^[8], 培养效果很好, 但同是致病疫霉属 (*Phytophthora*) 的马铃薯晚疫病菌接种在胡萝卜培养基上, 却效果很差, 可见, 在致病疫霉属的不同种间对营养的需求并不一致。

黑麦与胡萝卜的混合培养基可以用来培养晚疫病菌, 但是在使用过程中发现不同的胡萝卜品种对试验的结果有着很大的影响, 有些胡萝卜品种与黑麦混合配制的培养基对晚疫病菌的培养效果不如单纯黑麦的培养效果好, 甚至有些品种生长极为缓慢, 具体原因不祥。所以, 在使用这种培养基的时候最好做一下预备试验, 选择合适的胡萝卜品种。

[参 考 文 献]

- [1] 宋伯符, 谢开云. CIP 的全球晚疫病防治倡议与我国的参与 [J]. 马铃薯杂志, 1997, 11(1): 51- 55.
- [2] 林传光. 几种疫霉在营养上对于氮、钙和有机物的要求及浓度关系的研究 [J]. 微生物学报, 1965, 11(4): 11.
- [3] 黄河, 徐大雅, 林传光. 适宜于马铃薯晚疫病菌的一种液体合成培养基 [J]. 植物病理学报, 1963, 6(2): 225- 227.
- [4] 方中达. 植病研究方法 [M]. 北京: 农业出版社, 1977: 123- 129.
- [5] Forbes G A. Laboratory manual for *P. infestans* works at CIP- Quito, Potato late blight control in China. Proceeding of a workshop held in Beijing [C]. Beijing: China Agriculture Publishing Company, 1993: 149- 157.
- [6] Caten C E, Jinks L L. Spontaneous variability of *Phytophthora infestans*. I. Cultural variation [J]. Can J Bot, 1968, 46: 329- 348.
- [7] 姚裕琪, 梁德霖, 孔繁春. 适宜马铃薯晚疫病菌生长的豆类培养基筛选 [J]. 华北农学报, 1998, 13(3): 88- 90.
- [8] 陈宏宇. 大豆疫霉根腐病菌 *Phytophthora sojae* 同工酶及 RAPD 标记研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2001.

Modification of Media Suitable for Growing *Phytophthora infestans*

Jin Guanghui^{1,2}, Bai Yamei¹, Sun Xiumei³, Xu Xuepu⁴, Lu Wenhe¹

(1. Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China;

2. Heilongjiang August First Land Reclamation University, Daqing, Heilongjiang 163319, China;

3. Potato Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Keshan, Heilongjiang 161606, China;

4. Daxinganling Agricultural Research Institute, Jiagedaqi, Heilongjiang 165000, China)

Abstract: Late blight, caused by *Phytophthora infestans*, is most devastating disease of crops worldwide, in particular for potato. It is crucial to establish a medium suitable for growing the fungus in order to study it. In this research, five media, including extracts of rye and carrot in different combinations, were compared for colony diameter and sporangium production, which were investigated at intervals after inoculation in a complete randomized design. The data indicated that the medium with extract of rye and carrot in a ratio of 1 to 1 gave the best result, in which the fungus grew quickly and produced more sporangia. Therefore, this medium could be used for growing *P. infestans* and would facilitate study of the fungus.

Key Words: potato; *Phytophthora infestans*; medium