

中图分类号: S532; S436.412.1*2 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2007)04-0203-03

马铃薯晚疫病菌培养条件的研究

李惠霞^{1,2}, 刘永刚³, 王 蒂¹, 杨富银²

(1. 甘肃农业大学作物遗传改良与种质创新重点实验室, 甘肃 兰州 730070;

2. 甘肃农业大学草业学院植物病理系, 甘肃 兰州 730070; 3. 甘肃农业科学院植物保护研究所, 甘肃 兰州 730070)

摘 要: 通过对马铃薯晚疫病菌在7种不同培养基上及不同温度下的菌落生长和产孢情况的比较观察, 对马铃薯晚疫病菌的培养条件进行筛选。结果表明, 马铃薯晚疫病菌在黑麦培养基上的生长速度最快, 产孢量最大, 燕麦培养基次之, V₈培养基和PDA最差。在5~25℃温度范围内, 马铃薯晚疫病菌均能产生孢子囊, 但以20℃产生孢子囊数目最多且孢子囊较大。

关键词: 马铃薯; 晚疫病菌; 培养基; 温度

马铃薯是我国重要的粮菜兼用作物, 马铃薯晚疫病是由 *Phytophthora infestans* (Montagne) de Bary 引起的世界性的毁灭性病害之一, 对农业生产危害极大。对该病害进行研究具有重要的意义, 但无论是进行植物病原菌研究还是寄主抗病性研究, 首先要解决病原菌的菌种问题。马铃薯晚疫病是

寄生性较强的病原真菌, 分离纯化相当困难。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, 对温度也有特殊的要求^[1], 很难有效的分离培养得到纯菌株。缺乏病原菌纯菌种是目前国内困扰许多植物病理工作者和育种工作者顺利进行研究工作的难题。研究中确定适宜的培养基是关键的一环, 适宜的温度也是病原菌生长的重要条件。本试验通过对7种培养基上马铃薯晚疫病菌生长测定, 以期找出适宜的培养基, 并对病菌适宜的生长温度和产孢温度进行了测定。

收稿日期: 2007-03-10

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划)项目(2001AA241132)资助。

作者简介: 李惠霞(1972-), 女, 博士研究生, 讲师, 主要从事植物真菌病害研究。

Optimization of Meristem Culture for Elimination of Viruses in Potato

Qi Enfang, Wang Yihang, Zhang Wu, Li Yuping

(Potato Research Institute, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730070, China)

Abstract: Potato cultivar, Longshu No.6, was used in this experiment to study the effects on survival rate of meristem size, hormones and activated charcoal in meristem culture. The meristem with 2 primordia was optimal explant in vitro. Supplementation of 6-BA 0.5 mg·L⁻¹, GA₃ 0.1 mg·L⁻¹ or NAA 0.1 mg·L⁻¹ to MS promoted the differentiation of Longshu No.6 meristem tip. By supplementation of 0.05% activated charcoal to MS, the time of plant formation was advanced by 13 days and sprouting percentage was increased by 7.5%.

Key Words: potato; meristem tip culture; sprouting percentage

1 材料与方 法

1.1 供试菌种

马铃薯晚疫病菌(*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary)由甘肃农业大学草业学院植物病理实验室分离纯化。

1.2 培养基及其制备

白芸豆培养基: 白芸豆粉 18 g 加水 1 000 mL, 在 60℃ 下水浴 1 h, 双层纱布过滤去渣。上清液补足水 300 mL, 加入琼脂 5.4 g, 分装, 灭菌。

V₈ 培养基: 10 mL V₈ 汁加去离子水 90 mL, CaCo 30.02 g, 琼脂 2 g, 分装, 灭菌。

胡萝卜培养基: 将 60 g 新鲜胡萝卜切成小片, 加去离子水 200 mL, 用组织捣碎机捣碎约 40 s, 用四层纱布过滤去渣, 补足水至 300 mL, 加琼脂 5.4 g, 分装, 灭菌。

燕麦培养基: 燕麦片 9 g 加水 200 mL, 60℃ 水浴 1 h, 双层纱布过滤去渣。上清液补足水 300 mL, 加入琼脂 5.4 g, 煮沸待琼脂熔化后分装, 灭菌。

黑麦培养基: 黑麦种子 15 g 在 200 mL 去离子水中浸泡 24~36 h, 在 121℃ 高压蒸汽灭菌 30 min, 经四层纱布过滤去渣。上清液补足水至 300 mL, 加入琼脂 5.4 g, 分装, 灭菌。

PDA: 马铃薯去皮切碎, 称取 100 g, 加入水 400 mL 煮 30 min 用纱布滤去马铃薯, 加水补足 500 mL, 然后加葡萄糖 5 g, 琼脂 5.4 g, 分装, 灭菌。

PSA: 马铃薯去皮切碎, 称取 100 g, 加水 400 mL 煮 30 min 用纱布过滤, 加水补足 500 mL,

然后加蔗糖 5 g, 琼脂 5.4 g, 分装, 灭菌^[2-3]。

1.3 试验方法

1.3.1 不同培养基上马铃薯晚疫病菌生长情况

在无菌条件下打取新鲜培养的马铃薯晚疫病菌菌饼, 将其接种到上述 7 种培养基, 设 4 次重复。接种后将培养皿置于 20℃ 恒温箱中暗培养, 接种后 10 d 用十字交叉法测量菌落的大小, 并在显微镜 10× 镜下测定孢子囊的数量, 每个培养皿观察 5 个视野, 计数每个视野内的孢子囊数。同时测量孢子囊的大小, 每个培养皿观察 5 个视野, 每个视野用测微尺测量 10 个孢子囊。

1.3.2 不同温度下马铃薯晚疫病菌的接种

采用黑麦培养基, 设 7 个温度处理, 4 个重复。在无菌条件下将供试的马铃薯晚疫病菌菌饼接种至黑麦培养基, 分别置于 5℃, 10℃, 15℃, 18℃, 20℃, 22℃, 25℃ 恒温箱中暗培养。接种后 10 d, 在显微镜 10× 镜下测定孢子囊的数量和大小, 方法同上; 并用十字交叉法测量菌落的大小。

菌落直径和孢子囊数量的差异显著性采用 DPS^[4] 软件处理。

2 结果与分析

2.1 不同培养基上马铃薯晚疫病菌的生长情况

由表 1 可见, 马铃薯晚疫病菌在黑麦培养基上生长速度最快, 燕麦培养基次之, 二者无显著差异; 病菌在 V₈ 培养基与 PDA 培养基上生长速度最慢, 二者无显著差异。说明黑麦培养基上马铃薯晚疫病菌的生长速度最快, 燕麦培养基上次之。

表 1 马铃薯晚疫病菌在不同培养基上的生长情况

培养基名称	菌落直径(cm)	孢子囊大小(μm)	孢子囊数量(个)
黑麦培养基	3.55 Aa	(26.70~28.74)×(21.76~18.83)	4 908.30 A a
燕麦培养基	3.15 Aa	(26.35~28.34)×(17.75~18.83)	3 684.30 B b
白芸豆培养基	1.37 BC bc	(21.74~22.65)×(17.73~18.66)	12.30 C c
PSA	1.57 B b	(20.16~22.35)×(17.76~18.23)	7.70 C c
PDA	0.73 C d	(20.16~21.25)×(16.35~17.72)	0.67 C c
V ₈ 培养基	0.85 BC cd	无孢子囊	0.00 C c
胡萝卜培养基	1.42 BC bc	无孢子囊	0.00 C c

注: 表中大写字母表示在 0.01 水平上差异显著; 小写字母表示在 0.05 水平上差异显著(下同)。

马铃薯晚疫病菌在黑麦培养基上产孢量最大, 燕麦培养基次之, 二者存在显著和极显著差异; 白芸豆培养基、PSA 和 PDA 上产生极少量的孢子

囊, 而胡萝卜培养基和 V₈ 培养基上不产生孢子囊。另外, 马铃薯晚疫病菌孢子囊大小在不同培养基上差别不大, 但以黑麦培养基和燕麦培养基上所

产的孢子囊较大, 白芸豆培养基、PSA 和PDA 上的略小。

2.2 不同温度下马铃薯晚疫病菌的生长情况

由表 2 可见, 马铃薯晚疫病菌在 20℃ 生长速度最快, 18℃ 和 15℃ 次之, 三者间无显著差异; 5℃

和 25℃ 下, 病菌生长速度最慢。病菌在 20℃ 条件下产孢量最大, 22℃ 与 18℃ 条件下次之, 后二者间无显著差异; 5℃ 和 25℃ 下, 病菌产孢量最最少。马铃薯晚疫病菌孢子囊大小在不同的温度条件下差别不大, 但以 20℃ 和 22℃ 条件下产生的孢子囊较大。

表 2 马铃薯晚疫病菌在不同温度下生长测定结果

温 度	菌落直径(cm)	孢子囊大小(μm)	孢子囊数量(个)
25℃	0.55 B b	(20.65~21.74)×(16.73~18.66)	569.330 D e
22℃	1.59 B b	(26.35~28.57)×(17.45~18.83)	1 651.660 B b
20℃	3.76 A a	(26.72~28.74)×(17.76~18.83)	2 106.333 A a
18℃	3.74 A a	(21.74~22.65)×(17.73~18.66)	1 512.000 B b
15℃	3.11 A a	(20.16~22.35)×(17.76~18.23)	1 123.330 C c
10℃	1.55 B b	(20.16~21.25)×(16.35~17.72)	869.000 CD d
5℃	0.57 B b	(20.35~21.34)×(17.75~18.83)	589.000 D e

3 结 论

培养基比较试验表明, 在相同的条件下, 马铃薯晚疫病菌在黑麦培养基上生长速度最快, 产生的孢子囊最多且孢子囊较大, 是最为理想的培养基; 燕麦培养基因其材料易得, 制作简单, 是较好的替代培养基。其他供试培养基的试验结果均不太理想。

培养温度的筛选试验中, 在其它条件相同时, 5~25℃ 都能产生孢子囊, 20℃ 产孢量最大, 且生长速度最快, 为马铃薯晚疫病菌最佳培养温度, 其次为 18℃ 和 15℃。这与其他研究者所采用的培养温

度略有差异^[4], 这种差异是否为病原菌采自不同地区所致, 还需进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] 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.
- [2] 郑小波. 疫霉菌及其研究技术 [M]. 北京: 中国农业出版, 1997: 81-83.
- [3] 方中达. 植病研究方法 [M]. 北京: 农业出版社, 1997: 123-129.
- [4] 朱杰华, 张志铭, 杨志辉. 马铃薯晚疫病菌的常规研究方法, 河北农业大学学报, 2001, 24(2): 112-114.

Studies on Suitable Cultural Condition of *Phytophthora infestans*

Li Huixia^{1,2}, Liu Yonggang³, Wang Di¹, Yang Fuyin²

(1. Gansu Key Labortory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China;

2. Department of Plant Pathology, College of Grassland, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China;

3. Plant Protection Institute, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730070, China)

Abstract: A comparison was made among seven different solid mediums for culturing the *Phytophthora infestans*. The results showed that the growth rate of *Phytophthora infestans* and the number of sporangium on rye medium were best and oat medium second, but V₈ medium and PDA were worst. A similar comparison was made among seven different temperatures. The result suggested that sporangia can be produced from 5℃ to 25℃, but optimal condition for *Phytophthora infestans* was 20℃.

Key Words: *Phytophthora infestans*; cultural medium; temperature