

培养条件对马铃薯晚疫病菌粗毒素产生的影响

邢宇俊,程智慧

(西北农林科技大学 园艺学院,陕西 杨凌 712100)

[摘要] 研究了马铃薯晚疫病菌菌株 5-4 在不同培养基、光照、温度、pH 值、振荡培养方式等条件下产生毒素的情况,并用番茄种子发芽法检测了毒素的毒性。结果表明,适宜马铃薯晚疫病菌粗毒素培养的培养基为黑麦液体培养基,培养基 pH 值为 6.0~7.0,培养温度 20~22 C,在黑暗条件下连续振荡培养 16 d 时产生的粗毒素的毒性最强。

[关键词] 马铃薯晚疫病菌;培养条件;粗毒素

[中图分类号] S435.32

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)03-0089-04

马铃薯晚疫病是由致病疫霉(*Phytophthora infestans* de Bary)侵染引起的一种真菌性病害,该致病病菌寄主范围狭窄,主要侵染马铃薯、番茄等茄科植物,是世界性马铃薯灾害性病害^[1-4]。选育抗病性品种是控制马铃薯晚疫病的重要手段,但目前的育种途径主要是组合育种、远缘杂交、体细胞杂交和分子育种,在应用细胞无性系进行抗病性筛选方面尚未见报道^[2,4]。据章元寿^[5]报道,病菌毒素不但可用于筛选抗病材料,而且在适当的选择剂量下,还可作为一种外源激发子来诱导植物产生抗性或促进植物生长。但有关马铃薯晚疫病菌毒素在何种培养条件下产量高,及产生的病菌毒素的致病性如何,尚未见系统的研究报道。本研究探讨了不同培养基、培养基 pH 值,以及光照、温度和振荡培养方式等培养条件对马铃薯晚疫病菌培养过程中产毒的影响,以明确马铃薯晚疫病菌毒素产生的适宜培养条件,为马铃薯晚疫病菌毒素培养,以及应用该毒素进一步开展马铃薯抗晚疫病无性系离体筛选奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 供试病菌与粗毒素提取

供试马铃薯晚疫病菌病原菌株为 5-4,由河北农业大学提供。病菌在进行液体培养前 10 d 接种至黑麦固体培养基中繁殖。用直径 5 mm 打孔器取菌株长势均匀的菌饼用于接种。

将不同培养条件培养获得的马铃薯晚疫病菌培养液,用双层灭菌滤纸滤去菌丝体,滤液经 4 000 r/min 离心 10 min,上清液经过滤得马铃薯晚疫病菌病原菌粗毒素。用番茄种子发芽法检测粗毒素的毒性。

1.2 病菌培养条件

1.2.1 培养基 分别在 4 个 250 mL 三角瓶中定量倒入 100 mL pH 7.0 的黑麦、燕麦、大豆和胡萝卜等 4 种不同的病菌培养基,用接种针挑取马铃薯晚疫病菌菌饼 6 块,接种于各培养基中,每处理重复 3 次。置 22 C 黑暗条件下 120~190 r/min 振荡培养,在不同培养时间取样制备马铃薯晚疫病菌粗毒素。

1.2.2 光照 在 250 mL 三角瓶中定量倒入 100 mL pH 7.0 的黑麦培养液,用接种针挑取马铃薯晚疫病菌菌饼 6 块,接种于三角瓶中,设黑暗(牛皮纸遮光)、每天光照 12 h 和每天光照 24 h 3 个处理,重复 3 次,培养温度 22 C,静止培养。在不同培养时间取样制备马铃薯晚疫病菌粗毒素。

1.2.3 温度 在 250 mL 三角瓶中定量倒入 100 mL pH 7.0 的黑麦培养液,用接种针挑取马铃薯晚疫病菌菌饼 6 块,接种于三角瓶中,分别置于 18, 20, 22, 24 和 26 C 恒温箱中静止培养,每天早、晚人工各振荡 1 次,在不同培养时间取样制备马铃薯晚疫病菌粗毒素。

[收稿日期] 2005-07-21

[基金项目] 中德政府间合作项目(GH-01/04);中德农业部科技合作项目

[作者简介] 邢宇俊(1977-),女,山东莱芜人,在读硕士,主要从事蔬菜细胞生物技术研究。

[通讯作者] 程智慧(1958-),男,陕西兴平人,教授,博士生导师,主要从事蔬菜栽培生理和生物技术研究。E-mail:chengzh@nwsuaf.edu.cn

1.2.4 振荡培养方式 在250 mL三角瓶中定量倒入100 mL pH 7.0的黑麦培养液,用接种针挑取马铃薯晚疫病菌菌饼6块,接种于三角瓶中,在22℃恒温条件下培养,设置持续振荡培养、每天振荡12 h培养和静止培养3个振荡培养方式,振荡速度120~190 r/min,重复3次。在不同培养时间取样制备马铃薯晚疫病菌粗毒素。

1.2.5 pH值 在250 mL三角瓶中定量倒入100 mL pH 4.0,5.0,6.0,7.0和8.0的黑麦培养液,移入6块马铃薯晚疫病菌菌饼,22℃恒温振荡培养,18 d后制备马铃薯晚疫病菌粗毒素。

1.3 病菌毒素的生物检测

病菌毒素生物测定所用植物材料为栽培番茄(*Lycopersicon esculentum* L.)品种毛粉802,采用种子发芽法检测病菌毒素的毒性,以种子发芽率判定毒素产量。具体方法为:将经表面消毒的番茄种子播

种在直径90 mm的消毒培养皿滤纸发芽床上,每皿30粒种子,加入供试病菌粗毒素10 mL,25℃条件下恒温保湿培养10 d,统计种子发芽情况。

2 结果与分析

2.1 不同培养基对菌株产生毒素毒性的影响

从图1可以看出,用黑麦、燕麦、大豆和胡萝卜4种液体培养基培养的马铃薯晚疫病菌病原菌粗毒素处理番茄种子,在一定培养时间内,从黑麦培养基中得到的病菌粗毒素对番茄种子发芽的抑制作用最强。培养16 d时,用黑麦培养滤液处理的番茄种子发芽率仅为6.6%,而用从大豆、燕麦和胡萝卜培养基中得到的病菌粗毒素处理番茄种子后,其发芽率分别为10.7%,12.4%和13.6%。可见黑麦培养基最适合马铃薯晚疫病菌株的生长和毒素的产生。

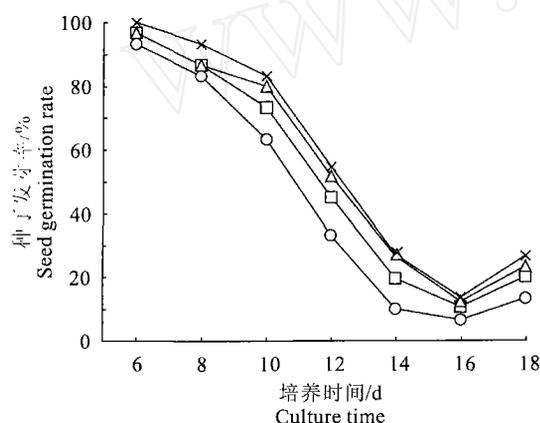


图1 不同培养基中菌株产生的粗毒素对番茄种子发芽的影响

—○—, 黑麦培养基; —□—, 燕麦培养基;
—△—, 大豆培养基; —×—, 胡萝卜培养基

Fig. 1 Effect of crude toxin produced by pathogen in different culture media on tomato seed germination

—○—, Rye medium; —□—, Oat medium;
—△—, Soybean medium; —×—, Carrot medium

2.2 光照条件对菌株产生毒素毒性的影响

由图2可以看出,在不同培养时期,黑暗条件下培养病原菌得到的病菌粗毒素对番茄种子发芽的抑制作用均最强,而每天光照24 h和每天光照12 h得到的病菌粗毒素对番茄种子发芽的抑制作用均较黑暗条件下略低。由此可见,黑暗条件能增加菌株的毒素产量,致使毒性增加,说明黑暗对病原菌产毒较为适宜。

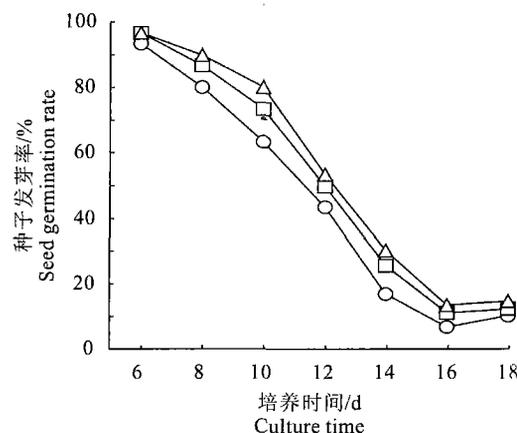


图2 不同光照条件下菌株产生的粗毒素对番茄种子发芽的影响

—○—, 黑暗; —□—, 光照12 h/d;
—△—, 光照24 h/d

Fig. 2 Effect of crude toxin produced by pathogen under different lightening times on tomato seed germination

—○—, Dark; —□—, Lightening 12 h/d;
—△—, Lightening 24 h/d

从整个培养阶段来看,黑暗条件下培养16 d时,病原菌粗毒素对番茄种子发芽率的抑制作用最强,发芽率达到最小值6.8%;培养16 d之后,病菌粗毒素对番茄种子发芽的抑制作用稍有降低;当培养18 d时,番茄种子发芽率又回升到10.2%。因此,马铃薯晚疫病菌较适宜的培养条件和时间为黑暗条件下培养16 d左右。

2.3 温度对菌株产生毒素毒性的影响

温度对马铃薯晚疫病毒素的毒性影响较大。由图3可以看出,马铃薯疫霉病菌在不同温度下培养,随培养时间延长,产生的粗毒素使番茄种子发芽率

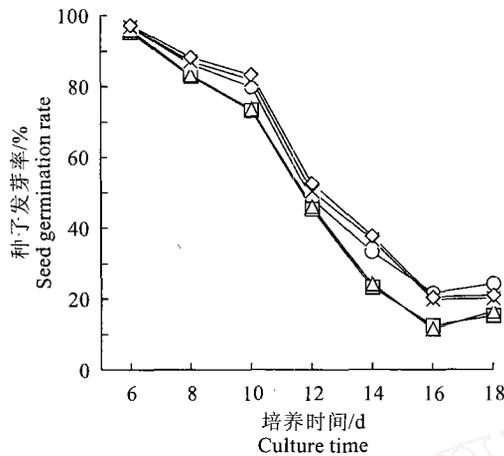


图3 不同温度下菌株产生的粗毒素对番茄种子发芽的影响

—○—, 18 °C; —□—, 20 °C; —△—, 22 °C;
—×—, 24 °C; —◇—, 26 °C

Fig. 3 Effect of crude toxin produced by pathogen under different temperatures on tomato seed germination

—○—, 18 °C; —□—, 20 °C; —△—, 22 °C;
—×—, 24 °C; —◇—, 26 °C

各温度处理间相比,在20~22 °C下培养,病菌产生粗毒素的能力最强,表现为番茄种子发芽率一直低于其他各处理;在培养16 d时,番茄种子发芽率降至最小值11.5%~12.4%,即病菌粗毒素的毒性最强。18,24和26 °C下培养,病菌产生粗毒素的能力均明显低于20和22 °C,在培养16 d时,番茄种子发芽率分别为21.6%,19.8%和20.5%,处理间差异很小。

2.4 振荡培养方式对菌株产生毒素毒性的影响

由图4可以看出,静止培养条件下病菌产生的毒素对番茄种子发芽率的影响较振荡条件下小,每天24 h振荡培养产生的毒素对番茄种子发芽的影响最大,每天12 h振荡培养产生的毒素对番茄种子发芽的影响居中。可见,振荡条件有利于病原菌的生长和产毒,且连续振荡培养较间歇振荡培养产生的毒素毒性更强。由图4还可以看出,无论在何种培养方式下,均于培养到14~18 d时毒素毒性最强,对番茄种子发芽的抑制作用最大,说明振荡培养16 d

逐渐下降;在培养16 d时生物检测的番茄种子发芽率最低,说明病菌毒素的毒性最大;继续培养,生物检测的番茄种子发芽率开始上升;番茄种子发芽率随各温度下病菌培养时间的变化趋势相似。

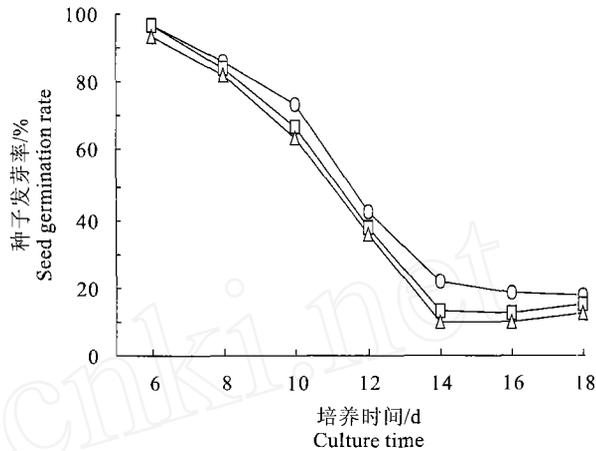


图4 不同振荡培养方式下菌株产生的粗毒素对番茄种子发芽的影响

—○—, 静止; —□—, 振荡12 h/d; —△—, 振荡24 h/d

Fig. 4 Effect of crude toxin on tomato seeds between stationary state and different shaking conditions

—○—, Rest; —□—, Shaking 12 h/d;
—△—, Shaking 24 h/d

左右是产毒培养较适宜的时间。

2.5 pH值对菌株产生毒素毒性的影响

由表1可以看出,病菌培养液pH值对粗毒素毒性影响很大。培养前培养液pH值为6.0~7.0时,菌株培养产生的毒素对番茄种子发芽的抑制作用最大,发芽率分别为16.7%和15.6%,对胚根生长的抑制率分别为85.0%和82.6%。培养液pH值继续降低,产生的粗毒素对番茄种子发芽和胚根生长的抑制作用降低,在pH值为5.0和4.0时,番茄种子发芽率分别为27.8%和37.8%,对胚根生长的抑制率分别为67.6%和48.8%。pH值偏碱性也不利于病菌产毒,培养液pH值为8.0时,番茄种子的发芽率和胚根抑制率分别为45.6%和36.2%。由表1还可看出,无论培养前pH值为多少,培养一段时间后培养液pH值均接近于7.0。因而在培养晚疫病菌时,pH值保持在6.0~7.0对病菌产生毒素最为有利。

表 1 不同 pH 值培养液下菌株产生的毒素对番茄种子发芽的影响

Table 1 Effect of crude toxin produced by *Phytophthora infestans* in different pH culture media on tomato seed germination

培养前的 pH pH before culture	培养后的 pH pH after culture	种子发芽率/% Germination rate of tomato seedling	胚根抑制率/% Restriction percentage of tomato taproot
4.0	6.7	37.8	48.8
5.0	6.6	27.8	67.6
6.0	6.6	16.7	85.0
7.0	6.7	15.6	82.6
8.0	6.7	45.6	36.2

3 讨 论

研究病菌培养条件与粗毒素毒性的关系,对进一步深入研究毒素的理化特征、致病组分和致病机理,以及利用毒素进行抗病性筛选等具有重要意义。童蕴慧等^[6]利用不同抗性的番茄品种检测番茄早疫病病菌培养毒素的产量,发现不同培养条件下产生的病菌粗毒素毒性有较大差异,这可能是病菌在不同营养条件下产生的毒素种类和数量差异所致。吴嵩民等^[7]报道,不同培养条件下生长的棉花黄萎病菌毒素产量相差很大,培养 8 d 的产毒量仅为培养 14 d 的 1/3,可见适宜的培养条件对毒素高产有很大作

用。关于马铃薯晚疫病病原菌的产毒条件,在国内外尚未见系统的研究报告。本研究结果表明,培养条件对马铃薯晚疫病病菌产毒影响很大,在黑麦、燕麦、大豆和胡萝卜 4 种液体培养基中,以黑麦培养基最适于产毒培养;在 18~26 °C 的培养温度范围内,以 20~22 °C 最适于产毒培养;在黑暗条件下培养,产毒优于间歇光照或全光照培养;连续振荡培养优于间歇振荡培养或静止培养;培养液 pH 值保持在 6.0~7.0 最有利于产毒培养,降低或提高 pH 值均会降低病菌产毒。病菌培养 16 d 前后一般是毒素毒性最强的时期。

[参考文献]

- [1] Turkensteen L. J. Durable resistance of potato against *Phytophthora infestans*[C]//Jacobs T H. Parlevliet J E. Durability of disease resistance. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers, 1993: 115-124.
- [2] 李先平,何云昆,赵志坚,等. 马铃薯抗晚疫病研究进展[J]. 中国马铃薯, 2001, 15(5): 290-295.
- [3] 金光辉,文景芝,丁广洲. 我国马铃薯晚疫病的研究现状和建议[J]. 黑龙江农业科学, 2002(6): 28-31.
- [4] 凌永胜,汤红玲. 马铃薯抗晚疫病转基因育种研究现状及发展趋势[J]. 福建农林科技, 2004(4): 47-48.
- [5] 章元寿. 关于植物病原菌毒素研究中几个问题的商榷. 全国第三届植物病原菌毒素学术研讨会论文摘要集, 1995: 1-3.
- [6] 童蕴慧,徐敬友,袁素玲. 番茄早疫病病菌培养滤液的毒性及不同品种对滤液的敏感性[J]. 江苏农业学报, 1997, 13(4): 250-251.
- [7] 吴嵩民,夏正俊,傅正擎,等. 培养条件对棉花黄萎病菌毒素产生的影响[J]. 江苏农业学报, 1999, 15(2): 96-99.

The effects of culture conditions on production of *Phytophthora infestans* crude toxin

XING Yu-jun, CHENG Zhi-hui

(College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The effects of pathogen *Phytophthora infestans* culture conditions, such as culture medium, light, temperature, pH value and shaking, on crude toxin production were studied using tomato seed germination as the biologic test of toxicity of crude toxin. The results showed that the favorable culture conditions were rye liquid medium, pH value 6.0—7.0, culture temperature 20—22 °C with successive darkening and shaking during culture. The production of crude toxin reached the highest level on the 16th day of culture.

Key words: *Phytophthora infestans*; culture condition; crude toxin