

贵州省烟草黑胫病菌的交配型及其分布初探

彭丽娟^{1,2}, 丁海霞³, 葛永怡⁴

(1. 贵州省烟草品质研究重点实验室, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州大学 农学院, 贵州 贵阳 550025;
3. 中国农业大学 农学与生物技术学院, 北京 100193; 4. 贵州大学 生命科学学院, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 采用培养皿配对培养的方法, 对分离自贵州省 8 个地区(州、市)的烟草黑胫病菌(*Phytophthora nicotianae* var. *nicotianae*)的交配型进行测定。结果表明: 来自贵州省主要产烟区的 42 株烟草黑胫病菌菌株均属 A₂ 交配型, 未检测到其他交配型。据研究结果可初步认定, 贵州省烟草黑胫病菌的交配型符合烟草疫霉(*P. nicotianae* Breda de Haan)交配型在我国的分布规律。

关键词: 烟草黑胫病; 烟草疫霉; 交配型; 贵州省; 分布

中图分类号: S435.72 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2011)11-0093-04

Mating Type and Distribution of *Phytophthora nicotianae* in Guizhou Province

PENG Li-juan^{1,2}, DING Hai-xia³, GE Yong-yi⁴

(1. Guizhou Key Laboratory for Tobacco Quality, Guiyang 550025, China;
2. Agricultural College, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 3. College of Agriculture and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China; 4. College of Biology and Technology, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: Mating types of 42 isolates of *Phytophthora nicotianae* var. *nicotianae* isolated from eight areas of Guizhou province were investigated by the method of partnership culture *in vitro* on V8 medium. The results showed that the A₂ mating type strains of *P. nicotianae* were the predominant in Guizhou province. Other mating types were not observed. According to the results, the geographical distribution of *P. nicotianae* mating type in Guizhou was in line with that of *P. nicotianae* Breda de Haan mating type in China.

Key words: Tobacco black shank; *Phytophthora nicotianae*; Mating type; Guizhou province; Distribution

烟草疫霉(*Phytophthora nicotianae* Breda de Haan)的寄主范围很广, 在全世界广泛分布, 是异宗配合的疫霉菌^[1-2]。其烟草变种(*P. nicotianae* var. *nicotianae*)引起的烟草黑胫病是烟草上的重要病害, 在贵州省该病常与烟草青枯病混合发生。烟株发病后很快萎蔫死亡, 对烟叶的产量和品质影响极大, 给生产上造成巨大损失^[3-4]。我国有关烟草疫霉的交配型及分布已有一些报道^[5-6], 但迄今尚未见有

关贵州省烟草疫霉交配型及分布的报道。异宗配合的疫霉菌通常需要不同交配型的菌株相互诱导才能进行有性生殖^[5], 而有性生殖过程中的基因重组是导致病菌生物学性状多样化和致病力分化的主要原因, 可以使该菌具有更强的生存能力、致病力以及更广的寄主范围^[6]。因此, 研究烟草疫霉交配型的分布对贵州省烟草黑胫病的防治及抗病育种, 在理论和实践上均具有重要意义。

收稿日期: 2011-07-07

基金项目: 铜仁地区烟草公司项目(贵铜烟(2009)10)

作者简介: 彭丽娟(1973-), 女, 贵州毕节人, 副教授, 硕士, 主要从事植物病原真菌学及真菌病害的教学与研究。

E-mail: agr. ljpeng@gzu.edu.cn

1 材料和方法

1.1 供试菌株

CBS310.62 与 CBS311.62 两株标准交配型菌株均为烟草疫霉(*P. nicotianae* Breda de Haan),购自荷兰微生物菌种保藏中心(Centraalbureauvoor Schimmelcultures, CBS, 网址: www. cbs. knaw. nl/). 其中 CBS 310.62 为 A₁ 交配型, CBS 311.62 为 A₂ 交配型. 待测定菌株分别从贵州省的 8 个地区(州、市)采集,采集地点及菌株编号见表 1. 经分离、纯化和鉴定,共获得 42 个烟草黑胫病菌(*P. nicotianae* var. *nicotianae*)菌株.

表 1 供试烟草黑胫病菌菌株的编号及采集地

采集地点		菌株编号
贵阳市	开阳县	CGKY-1
		CGKY-3
		CGKY-4
		CGKY-5
		CGKY-5
遵义市	务川仡佬族苗族自治县	CZWC-1
		CZWC-2
安顺市	平坝县	CAPB-1
		CAPB-5
黔西南布依族苗族自治州	晴隆县	CXQL-1
		CXQL-2
		CXQL-3
		CXQL-5
		CXXR-2
		CXXR-3
	兴仁县	CXAL-1
		CXAL-2
		CXAL-3
		CXAL-4
		CXAL-5
		CXAL-6
铜仁地区	玉屏侗族自治县	CTYP-1
		CTYP-2
黔南布依族苗族自治州	长顺县 福泉市	CQCS-1
		CQFQ-1
		CQFQ-4
		CQFQ-5
		CQFQ-6
		CQFQ-6
毕节地区	大方县	CBDF-2
		CBDF-4
		CBNY-1
		CBBJ-1
	纳雍县 毕节市	CBBJ-3
		CBBJ-4
		CBBJ-5
	金沙县 赫章县	CBJS-1 [#]
		CBHZ-2 [#]
		CLSC-1
六盘水市	水城县	CLSC-2
		CLSC-3
		CLSC-4
		CLSC-5
		CLSC-6
		CLSC-6

1.2 供试菌株的采集方法

2009 年 6 月至 2010 年 9 月,分别从贵州省贵阳

市、遵义市、安顺市、毕节地区等 8 个地区(州、市)的主要产烟区,采集发生烟草黑胫病症状较为典型的烟株(田间根茎部为褐色的烟株)。当天采集,用牛皮纸袋盛放,带回实验室后用刀将病株纵剖开,选择髓部颜色为褐色或为碟片状的烟株进行病菌的分离纯化。

1.3 供试菌株的分离纯化

V8 培养基^[6]: V8 汁(美国 Compbell 公司)100 mL 加水 900 mL,碳酸钙 0.2 g,琼脂 20 g。V8 选择性培养基:由 V8 培养基中加入青霉素、链霉素和多菌灵原药配制而成,所加的抗菌素含量一般为每 1000 mL 培养基加青霉素 5 mg、链霉素 3 mg、多菌灵原药 5 mg^[7]。V8 培养基用于烟草黑胫病菌的纯化、保存及交配型测定,V8 选择性培养基用于烟草黑胫病菌的分离。

参考郑小波^[7]的方法对烟株上的病菌进行分离纯化。将采集的新鲜烟草黑胫病标本用自来水冲洗干净,晾干,剖开茎基部发病部位,取病健交界处褐色的病组织。将病组织切成 2 mm×2 mm 左右大小,沿培养皿周缘直接置于 V8 选择性培养基表面,每个培养皿(直径 9 cm)放 6 块。在 28℃下培养 3~7 d,待菌落形成后,进行镜检,选择菌丝无隔膜菌株继续培养,待产生孢子囊后,镜检观察菌丝、厚垣孢子和孢子囊形态、颜色,对厚垣孢子和孢子囊大小进行测量,各测量 50 个,计算平均值。然后再从菌落边缘切取 2 mm×2 mm 的菌丝块转移至盛有 V8 培养基的试管斜面上,25℃黑暗培养 7 d 后,常温保存备用。

1.4 烟草黑胫病菌交配型的测定

烟草黑胫病菌交配型的测定参照王革等^[6]和郑小波^[7]的直接配对方法进行。将盛有 20~25 mL V8 培养基平板切割成约 10 mm×10 mm 大小的培养基块,将其挑入灭菌的直径为 9 cm 的培养皿内,每皿放置 9 块,分 3 行等距离排列。待测菌株和已知交配型菌株分别在 V8 培养基上(25℃)生长 3 d。测定时,挑取已知交配型菌株的菌丝块 1 块(大小约 2 mm×2 mm)置于 V8 培养基块的一端,在另一端接上同样大小的待测菌株菌丝块 1 块。每一待测菌株与已知的 A₁ 和 A₂ 交配型菌株以及自身分别配对。培养皿用封口膜封闭,置于 25℃培养箱中黑暗培养 10~15 d 后,用显微镜(放大倍数为 10×10)从培养皿底部仔细观察两菌落交界处及两侧是否产生卵孢子。每个处理设 3 次重复,试验重复 2 次。

待测菌株交配型的确定参照 Ko(1988)^[8]、Ann 和 Ko(1989)^[9]的标准进行。

2 结果与分析

2.1 菌株鉴定结果

分离纯化的 42 个菌株,在 V8 培养基上其气生菌丝生长旺盛,菌落质地均匀。镜检观察发现,菌丝粗细不均匀,菌丝膨大体有或无;孢子囊呈近球形、椭圆形、倒梨形或不规则形,平均大小 $36.94\mu\text{m}\times 29.87\mu\text{m}$,乳突明显;厚垣孢子圆形或卵形,壁厚,平均大小 $11.56\mu\text{m}\times 10.57\mu\text{m}$;游动孢子肾形或近圆形。在 V8 培养基上与标准交配型菌株配对 2~3 周以后,所有配对菌株都可以产生不同数量的卵孢子,单独培养不产生卵孢子。卵孢子近球形,棕褐

色,满器或部分满器,雄器围生,藏卵器小,球形,厚壁光滑。根据无性繁殖和有性生殖产生的孢子囊和卵孢子的形态特征,参照 Newhook 等^[10]和 Ho^[11]的检索表,将分离到的烟草黑胫病菌均鉴定为烟草疫霉(*P. nicotianae* Breda de Haan)。

2.2 烟草黑胫病菌的交配型及分布

经测定,来自贵州省 8 个地区(州、市)的 42 株烟草黑胫病菌全部为 A₂ 交配型,未检测到其他交配型(表 2)。初步分析表明,贵州省烟草黑胫病菌以 A₂ 交配型占绝对优势,在分离到菌株的 8 个地区(州、市)都有分布;A₁ 交配型在贵州可能没有分布或群体比例很小;A₁ 和 A₂ 2 种交配型在贵州的分布不呈均势(表 3)。

表 2 贵州省烟草黑胫病菌菌株的交配型测定结果

菌株编号	配对菌株			交配型	菌株编号	配对菌株			交配型
	CBS 310.62	CBS 311.62	自身			CBS 310.62	CBS 311.62	自身	
CGKY-1	+	—	—	A ₂	CTYP-2	+	—	—	A ₂
CGKY-3	+	—	—	A ₂	CQCS-1	+	—	—	A ₂
CGKY-4	+	—	—	A ₂	CQFQ-1	+	—	—	A ₂
CGKY-5	+	—	—	A ₂	CQFQ-4	+	—	—	A ₂
CZWC-1	+	—	—	A ₂	CQFQ-5	+	—	—	A ₂
CZWC-2	+	—	—	A ₂	CQFQ-6	+	—	—	A ₂
CAPB-1	+	—	—	A ₂	CBDF-2	+	—	—	A ₂
CAPB-5	+	—	—	A ₂	CBDF-4	+	—	—	A ₂
CXQL-1	+	—	—	A ₂	CBNY-1	+	—	—	A ₂
CXQL-2	+	—	—	A ₂	CBBJ-1	+	—	—	A ₂
CXQL-3	+	—	—	A ₂	CBBJ-3	+	—	—	A ₂
CXQL-5	+	—	—	A ₂	CBBJ-4	+	—	—	A ₂
CXXR-2	+	—	—	A ₂	CBBJ-5	+	—	—	A ₂
CXXR-3	+	—	—	A ₂	CBJS-1 [#]	+	—	—	A ₂
CXAL-1	+	—	—	A ₂	CBHZ-2 [#]	+	—	—	A ₂
CXAL-2	+	—	—	A ₂	CLSC-1	+	—	—	A ₂
CXAL-3	+	—	—	A ₂	CLSC-2	+	—	—	A ₂
CXAL-4	+	—	—	A ₂	CLSC-3	+	—	—	A ₂
CXAL-5	+	—	—	A ₂	CLSC-4	+	—	—	A ₂
CXAL-6	+	—	—	A ₂	CLSC-5	+	—	—	A ₂
CTYP-1	+	—	—	A ₂	CLSC-6	+	—	—	A ₂

注:“+”表示配对后能产生有性器官,“—”表示配对后不能产生有性器官

表 3 贵州省烟草黑胫病菌不同交配型的地理分布范围

交配型	地理分布范围
A ₁	未检测到
A ₂	全省均有分布
A ₀	未检测到
A ₁ A ₂	未检测到
A ₁ ,A ₂	未检测到

3 结论与讨论

本研究结果表明,分离自贵州省 8 个地区(州、

市)的 42 株烟草黑胫病菌经测定全部为 A₂ 交配型,未检测到其他交配型。因此,推测贵州省烟草黑胫病菌的有性生殖可能不常发生,有性生殖导致烟草黑胫病菌的致病力分化在该地区不起重要作用。因烟草疫霉通过无性繁殖产生变异的机会较小,故贵州省不同致病力菌株的组成可能较为稳定^[6]。

Ho 等^[5]和王革等^[6]的研究结果表明,烟草疫霉菌株的交配型在我国的分布规律为:总体呈均等趋势,华东和西南地区以 A₂ 交配型为主,华北和华南以 A₁ 交配型为主。马国胜等^[3]研究表明,

安徽省烟草疫霉以 A_2 交配型占绝对优势,且在全省各烟区都有分布;其次为 A_0 交配型,主要分布在安徽省固镇、凤阳等江淮老烟区; A_1 、 A_1A_2 和 A_1 、 A_2 交配型均未检测到。孙常伟^[12] 研究结果表明,重庆市烟草黑胫病菌以 A_2 交配型为主,其次为 A_0 交配型,未检测到其他交配型。本研究结果表明,贵州省烟草黑胫病菌的交配型符合上述分布规律。因试验中分离到的菌株相对较少,只能初步测定贵州省烟草黑胫病菌的交配型及分布情况,期望在后续研究中得出更全面、准确的测定结果。

参考文献:

- [1] 何汉兴,余永年,庄文颖,等.中国疫霉属异宗配合种的交配型[J].真菌学报,1983,2(3):187-191.
- [2] 李蕊倩.西葫芦根腐病原菌(*Phytophthora nicotianae*)的生物学特性研究[J].山西农业科学,2008,36(12):74-76.
- [3] 马国胜,高智谋.安徽省烟草黑胫病菌的交配型及其地理分布研究[J].植物病理学学报,2006,36(6):566-568.
- [4] 洪勇.贵州省烟草黑胫病的发病原因与防治措施[J].

现代农业科技,2010(10):166,172.

- [5] Ho H H, Yu Y N, Zhuang W Y, et al. Mating type of heterothallic species of *Phytophthora* in China[J]. Acta Mycologica Sinica, 1983, 2(3): 187-191.
- [6] 王革,郑小波,陆家云,等.云南烟草黑胫病菌的交配型及其分布[J].南京农业大学学报,1997,20(1):31-34.
- [7] 郑小波.疫霉菌及其研究技术[M].北京:中国农业出版社,1997.
- [8] Ko W H. Hormonal heterothallism and homothallism in *Phytophthora*[J]. Annual Review of Phytopathology, 1988, 26: 57-73.
- [9] Ann P J, Ko W H. Effect of chloroneb and ethazol on mating type of *Phytophthora parasitica* and *Phytophthora cinnamomi*, Bot. Bult[J]. Academia Sinica, 1989, 30: 207-210.
- [10] Newhook F J, Waterhouse G M, Stamps D J. Tabular key to the species of *Phytophthora* De Bary[J]. Mycological Papers, 1978, 143: 3-20.
- [11] Ho H H. Synoptic key to the species of *Phytophthora* [J]. Mycologia, 1981, 73(4): 705-714.
- [12] 孙常伟.重庆地区烟草黑胫病菌交配型及生理小种的研究[D].重庆:西南大学,2009:30-31.

(上接第 88 页)

3.4 地区调查不全面

我国记录的盾蚧种数与实际分布种数相差较大,许多地区调查不充分或者还缺少调查。从目前记载的采集标本数目和种类看,我国大陆南部和台湾地区有关的调查较多,而在西北部等地区,如新疆和西藏等调查较少,在以后的研究中应加强对边疆地区的盾蚧种类调查。

中国地大物博,资源丰富,应该还有很多蚧虫没有被调查和描述,根据目前的研究状况,要想加快蚧虫的研究步伐,不仅要进行传统的分类研究,还要运用分子生物学等方法进一步验证,这样才能对蚧虫进行更加准确的分类。

参考文献:

- [1] 梁爱萍.关于停止使用“同翅目 Homoptera”目名的建议[J].昆虫知识,2005,42(3):332-337.

- [2] Robinson N J. Zoological record [M]. York: Thomson Zoological Ltd., 1985-2010.
- [3] 汤祜德.中国园林主要蚧虫:第 2 卷[M].太谷:沈阳市园林科学研究所,山西农业大学,1984.
- [4] 汤祜德.中国园林主要蚧虫:第 3 卷[M].太谷:沈阳市园林科学研究所,山西农业大学,1986.
- [5] 汤祜德.中国园林主要蚧虫:第 1 卷[M].太谷:沈阳市园林科学研究所,山西农学院,1977.
- [6] 曾涛.中国盾蚧亚科分类研究(同翅目:盾蚧科)[D].杨凌:西北农林科技大学,1998.
- [7] 周尧.中国盾蚧志:第 2 卷[M].西安:陕西科技出版社,1985.
- [8] 周尧.中国盾蚧志:第 1 卷[M].西安:陕西科技出版社,1982.
- [9] 冯纪年,袁水霞,章伟年.中国牡蛎蚧属一新种记述(半翅目:盾蚧科)[J].昆虫分类学报,2006,28(4):265-267.
- [10] 袁水霞,冯纪年.中国安蛎蚧属一新种记述(半翅目:盾蚧科)[J].动物分类学报,2007,32(2):449-450.