

烟草疫霉菌及其病害 生态治理研究

Phytophthora nicotianae Breda de Haan
and the Ecological Control of Its Disease

马国胜 著



苏州大学出版社
Soochow University Press

烟草疫霉菌及其病害生态治理研究

Phytophthora nicotianae Breda de Haan
and the Ecological Control of Its Disease

马国胜 著

苏州大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

烟草疫霉菌及其病害生态治理研究/马国胜著. —
苏州: 苏州大学出版社, 2015. 12
ISBN 978-7-5672-1622-8

I. ①烟… II. ①马… III. ①烟草—黑胥病—防治
IV. ①S435.72

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2015)第 307520 号

书 名: 烟草疫霉菌及其病害生态治理研究

著 者: 马国胜

责任编辑: 倪 青

封面设计: 刘 俊

出版发行: 苏州大学出版社(Soochow University Press)

地 址: 苏州市十梓街1号 邮编: 215006

印 装: 宜兴市盛世文化印刷有限公司

网 址: <http://www.sudapress.com>

邮购热线: 0512-67480030

销售热线: 0512-65225020

开 本: 787mm × 1092mm 1/16 印张: 11 字数: 262 千

版 次: 2015 年 12 月第 1 版

印 次: 2015 年 12 月第 1 次印刷

书 号: ISBN 978-7-5672-1622-8

定 价: 28.00 元

凡购本社图书发现印装错误,请与本社联系调换。服务热线:0512-65225020

内 容 简 介

本书就分离自烟草植株活体的烟草疫霉菌(俗称烟草黑胥病菌)的发现与命名、基本研究方法、生物学特性、致病力分化、抗药性及其遗传变异与分子生物学技术在烟草疫霉菌研究中的应用等方面进行了较为全面、系统的研究和论述,并从环境生态学的角度提出了烟草疫霉菌及其所致病害生态治理的理论与实践。本书兼具理论性和实践性,涉及交叉研究领域,内容系统性强,观点新颖,具有较高的理论价值和较强的实践指导意义。本书既可供从事生物技术、环境科学、生态学、微生物学、农林生产、植物保护等方面研究和学习的相关人员阅读,也可以作为烟草及经济作物生产中疫病防治的理论资料和实践指导用书。

Summary

The book, which is named *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan and the Ecological Control of Its Disease, represents a comprehensive and systematic discussion on *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan, which was isolated from the tobacco plant in vivo, commonly known as tobacco black shank pathogenic fungus. And it also puts forward theoretical and practical proposals to control its disease. This book is an excellent reference on all aspects of discovery and naming, biological characteristics, pathogenicity differentiation, resistance and genetic variation, molecular biology, ecological control of its disease.

This book is provided with systematic contents and novel views, which can be consulted by learners and researchers in biotechnology, environmental science, ecological science, microbiology, agricultural and forestry production, plant diseases. It can also provide important theoretical information and practical guidance for researchers in disease prevention of tobacco crop and other economic plants.



前 言

疫霉属真菌是一群重要的真核微生物,也是一类重要的植物病原真菌,它所引起的植物病害通常被称为植物疫病。烟草疫霉菌是疫霉属真菌中的一种重要微生物,可以引起烟草等寄主植物产生较为严重的植物病害,导致重大经济损失。烟草疫霉菌可以分为两种类型,一种是以烟草为唯一寄主或专化寄主的烟草疫霉菌,另一种是寄主十分广泛的烟草疫霉菌。至今,除了寄主范围有所不同之外,人们尚未搞清楚这两种类型之间的关键性差异。本书所述对象专指前一种类型烟草疫霉菌,它是引起烟草黑胥病的唯一病原真菌。

近年来,随着科学技术手段的不断进步和研究范围的不断扩大,对具有寄主专化型的烟草疫霉菌的研究越来越多。但是,相对其他微生物而言,其研究仍然比较薄弱,需要及时对已有研究进行分析总结,以期为进一步研究打下基础。然而,到目前为止,关于烟草疫霉菌及其病害的专门著作较少。

自 1896 年在印度尼西亚的爪哇首次发现烟草疫霉菌以来,国内外同行已经对其命名、生理生化特性及综合治理等方面进行了较为广泛的研究,研究深度已经达到分子生物学水平,为我们在这一领域的继续探索提供了较为丰富的基础资料。作者也对烟草疫霉菌的生物学特性、抗药性遗传以及生态治理等方面进行了较为系统的研究,并取得了较为丰硕的成果,为进一步揭示烟草疫霉菌的生物学特性、抗药性遗传和生态治理提供了理论参考和实践指导。鉴于此,作者根据多年来在烟草疫霉菌及其所致病害方面的研究结果,综合前人留下的大量研究资料,撰写了本书,主要目的是把烟草疫霉菌阶段性研究成果加以归纳和分析,从而使得烟草疫霉菌的研究更加系统化,为从事烟草疫霉菌及其所致病害相关研究和生产应用的同行们提供力所能及的方便和帮助。

本书对烟草疫霉菌的发现与命名、基本研究方法、生物学特性、致病力分化、抗药性及其遗传变异与分子生物学技术在烟草疫霉菌研究中的应用等方面进行了较为全面、系统的研究和论述,并从环境生态学角度提出了烟草疫霉菌及其所致病害生态治理的理论与实践。



在本书相关研究、资料收集、书稿准备、撰写和出版过程中,得到了高智谋、杨柳燕、蔡平、邱学林、高正良、李振陆、郑小波、夏红、孙茂民等国内外专家教授的多方面指导、帮助和支持,同时得到了陈方新、陈莉、陈英、于森、于方群、孙学永、洪艳、姜顾琳、陶易、周春玮、杨欢等老师和同学的帮助,还得到了苏州大学出版社的大力支持,在此深表感谢。

由于本书所涉及的内容较为广泛且系统性强,加之作者的水平有限,书中难免会有一些疏漏和错误,恳请各位同行和广大读者批评指正。

马国胜

2015 年 11 月于苏州



目 录

第一章 烟草疫霉菌的发现	1
第一节 烟草疫霉菌的发现与命名	1
一、发现时间与地点	1
二、命名	1
三、分子生物学证据	2
四、观点讨论	3
第二节 烟草疫霉菌的地位与危害	3
一、分类地位	3
二、分布与危害机制	4
三、观点讨论	4
第二章 烟草疫霉菌的生物学	5
第一节 基本研究方法	5
一、采集、分离与纯化	5
二、培养基的配制	5
三、土壤浸出液的制取	6
四、孢子囊的诱导产生	7
五、单游动孢子无性系的建立	7
六、游动孢子固定方法的比较	7
七、孢子囊和菌丝体等的固定和形态观察	7
八、游动孢子萌发方式的观察	7
九、生理特性的测定	8
十、交配型的测定	8
十一、致病力分化研究	9
十二、寄主范围研究	11
十三、对甲霜灵的抗药性水平监测	11
十四、对甲霜灵的抗性遗传测定	11
十五、甲霜灵抗性菌株生活适存能力的测定	12
十六、实验数据的统计与处理	12



第二节 形态特征	13
一、生物学特征	13
二、生理生化特征	13
第三节 分类与鉴定	16
一、疫霉属真菌的种及其分组	17
二、疫霉菌的分类依据	18
三、种的鉴定步骤	21
四、种下分类	21
五、常见疫霉种检索表	22
第四节 交配型与性分化	23
一、交配型的发现	23
二、交配型的类型与测定	24
三、异宗配合机制与交配型的本质	24
四、性分化与性征类型	26
五、交配型及其地理分布意义	26
六、交配型的遗传变异及其调控机制	26
七、烟草疫霉菌的交配型及其地理分布	28
八、观点讨论	29
九、安徽省烟草疫霉菌的交配型及其地理分布研究	30
第五节 寄主范围	34
一、自然条件下的寄主范围	34
二、人工模拟条件下的寄主范围	35
三、对农作物及农田杂草侵染能力的研究	35
四、对园林园艺植物侵染能力的研究	49
第六节 培养性状	54
一、烟草疫霉菌培养性状的稳定性	54
二、烟草疫霉菌若干培养性状研究	55
三、烟草疫霉菌游动孢子生物学特性及萌发模式研究	61
第三章 烟草疫霉菌的致病力分化	67
第一节 致病性及其意义	67
一、致病性	67
二、致病性分化	67
三、致病性的意义	67
第二节 致病性与生理分化类型	68
一、致病性与生理分化的发现与机制	68
二、致病性与生理分化类型	68
三、致病性(力)与生理分化的主要途径	70



四、观点讨论	70
第三节 致病力分化鉴定方法	71
一、致病性与生理分化的鉴定方法	71
二、观点讨论	74
第四节 致病力影响因子	75
一、致病力主要影响因素	75
二、烟草黑胥病菌致病力的影响因子及其互作效应研究	75
第四章 烟草疫霉菌的抗药性及其遗传变异	83
第一节 抗药性及其产生原因	83
一、抗药性及其类型	83
二、抗甲霜灵菌株的发现	83
三、抗药性产生的原因	84
四、抗药性机制	85
第二节 抗药性测定方法	85
一、杀菌剂毒力的生物测定	86
二、疫霉菌对药物的抗药性测定	87
三、疫霉菌抗药性水平等级	88
第三节 抗药性遗传变异	89
一、烟草疫霉菌抗甲霜灵菌株的群体动态及抗性水平	89
二、烟草疫霉菌抗甲霜灵菌株的生物学性状遗传与变异	90
三、烟草疫霉菌抗甲霜灵菌株对甲霜灵抗性的遗传稳定性	90
第四节 抗药性治理策略	91
一、主要治理策略	91
二、诱导防卫反应的物质	92
第五节 烟草疫霉菌对主力药剂的抗药性风险	93
一、对苯基酰胺类杀菌剂的抗药性风险	93
二、对烯酰吗啉类杀菌剂的抗药性风险	94
三、烟草疫霉菌对甲霜灵的抗药性研究	95
第五章 烟草疫霉菌的分子生物学	102
第一节 基因工程技术	102
一、基因工程的基本含义	102
二、基因工程的主要过程	102
第二节 分子生物学技术在真菌研究中的应用	106
一、几种常用于植物病原真菌研究的分子生物学技术	106
二、现代分子生物学技术在植物病原真菌研究中的应用	108
第三节 分子生物学技术在烟草疫霉菌研究中的应用	111
一、用核酸分子杂交技术研究烟草疫霉菌发生动态	111



二、用 ELISA 法检测烟草疫霉菌	114
第六章 烟草疫霉菌所致病害的生态控制	115
第一节 烟草黑胫病	115
一、发现、分布与危害	115
二、症状与病原体	116
三、流行与预测	117
四、损失估计及损失机制	118
五、观点讨论	119
第二节 病害生态控制理论与实践	119
一、基本生态理论	119
二、有害生物综合治理(IPM)策略	122
三、有害生物生态治理(EPM)策略	124
四、生态控制实践的成功案例	127
五、对生态文明建设中的植物保护工作再认知	128
六、观点讨论	129
第三节 烟草疫霉菌的生态控制方法	129
一、抗病品种	129
二、轮作	130
三、栽培措施	131
四、化学防治	131
五、生物防治	133
六、观点讨论	135
参考文献	137
烟草疫霉菌显微摄影图片集	148
第一组:烟草疫霉菌的菌丝体显微照片(10×40)	148
第二组:烟草疫霉菌的孢子囊显微照片-1(10×40)	149
第三组:烟草疫霉菌的孢子囊显微照片-2(10×40)	150
第四组:烟草疫霉菌的孢子囊显微照片-3(10×40)	151
第五组:烟草疫霉菌的孢子囊附属丝显微照片(10×40)	152
第六组:烟草疫霉菌的游动孢子萌发显微照片(10×40)	153
第七组:烟草疫霉菌的孢子囊萌发显微照片-1(10×40)	154
第八组:烟草疫霉菌的孢子囊萌发显微照片-2(10×40)	155
第九组:烟草疫霉菌的游动孢子囊排孢显微照片(10×40)	155
第十组:烟草疫霉菌的游动孢子裂解显微照片(10×40)	155
后记	157



第一章 烟草疫霉菌的发现

烟草疫霉菌(*Phytophthora nicotianae* var. *nicotianae*),无论在正式命名之前还是正式命名之后,都被人们通俗地称为烟草黑胫病菌。它是引起烟草上的重要病害烟草黑胫病的唯一病原,可以危害包括烤烟、晾烟、晒烟、香料烟、白肋烟等在内的所有栽培烟草,破坏性极强,大田侵染后常造成烟株成片凋萎死亡。而且烟株一旦发病,往往都是整株性死亡,常给烟草生产造成毁灭性损失。自从烟草疫霉菌被发现、命名以来,世界各产烟国均对其进行了深入、广泛的研究,并取得了显著成果。近年来,随着植物病理学、生物化学和分子生物学的飞速发展,有关烟草疫霉菌的研究取得了可喜进展。

第一节 烟草疫霉菌的发现与命名

一、发现时间与地点

烟草疫霉菌是由 Breda de Haan 于 1896 年在印度尼西亚的爪哇首次发现并描述的,并被命名为烟草疫霉(*Phytophthora nicotianae* Breda de Haan)。

二、命名

自 1896 年在印度尼西亚的爪哇首次发现烟草疫霉菌以来,其命名一直存在争议。1913 年,Dastur 在印度发现了一种在形态上与烟草疫霉相似,可以侵染蓖麻(*Ricinus communis* L.),但不侵染烟草的疫霉,命名为寄生疫霉(*Phytophthora parasitica* Dastur)。1931 年,Tucker 在他的专著 *Phytophthora* 中接受并保留了“寄生疫霉”这一名称,把 *Phytophthora nicotianae* 作为 *Phytophthora parasitica* 的一个变种,将其中对烟草具有致病性的类型命名为寄生疫霉烟草变种(*Phytophthora parasitica* Dastur var. *nicotianae* Tucker),对烟草不致病的类型命名为寄生疫霉寄生变种(*Phytophthora parasitica* Dastur var. *parasitica* Tucker)。1963 年,Waterhouse 认为烟草疫霉和寄生疫霉是同物异名种,按照国际上的命名优先权原则,应采用“烟草疫霉(*Phytophthora nicotianae* Breda de Haan)”作为种名,取消“寄生疫霉(*Phytophthora parasitica* Dastur)”这一名称,并根据形态学上的差异进一步划分为两个变种,即烟草疫霉烟草变种(*Phytophthora nicotianae* Breda de Haan var. *nicotianae* Waterhouse)和烟草疫霉寄生变种(*Phytophthora nicotianae* Breda de Haan var. *parasitica* Waterhouse),并认为引起烟草黑胫



病的疫霉菌的正确命名应为烟草疫霉烟草变种(*Phytophthora nicotianae* Breda de Haan var. *nicotianae* Waterhouse)。这两个变种的主要划分依据是:烟草疫霉烟草变种藏卵器长度大于 28 μm ,有产生放射状菌丝的球形菌丝膨大体;而烟草疫霉寄生变种的藏卵器长度小于 28 μm ,无球形菌丝膨大体。在此后的研究中,有些研究者开始采纳 Waterhouse 的命名,用“*Phytophthora nicotianae* var. *nicotianae*”作为引起烟草黑胫病的疫霉菌的名称;有些研究者则继续沿用 Tucker 命名的“*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*”;也有些研究者采用“*Phytophthora nicotianae*”或“*Phytophthora parasitica*”作为引起烟草黑胫病的疫霉菌的名称,从而导致引起烟草黑胫病的疫霉菌在命名上的混乱局面。据不完全统计,该病菌的名称曾一度多达 20 种。

Erwin(1983)曾强烈要求重新定义这一组疫霉菌的名称,并提出以寄生疫霉烟草专化型(*Phytophthora parasitica* f. sp. *nicotianae*)作为引起烟草黑胫病的疫霉菌的名称。Ho & Jong(1989)、郑小波和陆家云(1989)、郑小波(1997)等经过形态学、血清学及分子生物学性状的广泛比较研究后认为,烟草疫霉(*Phytophthora nicotianae* Breda de Haan)和寄生疫霉(*Phytophthora parasitica* Dastur)是同一个种,不存在变种的差异,单纯根据形态特征无法区分两个变种,建议取消两个变种的划分,并根据命名优先权原则,认为应采用“烟草疫霉(*Phytophthora nicotianae* Breda de Haan)”作为引起烟草黑胫病的疫霉菌的学名,而寄生疫霉则被视为烟草疫霉的同物异名。Erselius & De Vallarieille(1984)的蛋白质谱带分析、Oudemans(1990)的同工酶分析、Forster 等(1990)的线粒体 DNA 分析等研究结果均支持 Ho 和郑小波等(1989)的意见。

本研究采用的学名为烟草疫霉菌(*Phytophthora nicotianae* Breda de Haan var. *nicotianae* Waterhouse),俗名为烟草黑胫病菌,并且两种名称在本书中均有使用。

三、分子生物学证据

近年来,随着分子生物学的飞速发展,分子生物学技术在疫霉属种的鉴定上开始广泛应用,并为烟草疫霉菌的正确命名提供了有价值的分子证据。

Panabieres 等(1989)用限制性片段长度多态性(RFLP)技术研究了 12 个烟草疫霉种的重复序列 DNA 多态性,其中 8 个为烟草黑胫病菌,分别来自美国、古巴和澳大利亚等地区,另外 4 株为非烟草寄主,来自法国和象牙海岸,结果发现这 12 个菌株的消解图谱完全一致,无法区别,从而表明无论来自烟草寄主或非烟草寄主的任何地区的菌株均具有相同重复序列的 DNA,所以烟草疫霉与寄生疫霉应是同一种的不同名称,并认为 Erwin(1983)命名的寄生疫霉烟草专化型(*Phytophthora parasitica* f. sp. *nicotianae*)是烟草黑胫病菌最适合的名称。Goodwin 等(1989)用 Hind III 和 EcoR I 消解寄生疫霉(*Phytophthora parasitica*)的 DNA 制备了对寄生疫霉特异性的放射性标记探针,并通过核酸分子杂交证明,寄生疫霉寄生变种和寄生疫霉烟草变种的 DNA 模板与该探针具有相同的互补序列,两个变种的 DNA 是同质的。Ersek 等(1994)设计了一对寡聚核苷酸特异引物,用于疫霉种 DNA 的 PCR 扩增,结果发现对寄生疫霉(烟草疫霉)的不同菌株都能扩增相同的 1kpb 产物,而其他疫霉种的 DNA 片段不能被扩增。罗文富等(1998,1999)根据 Ersek 设计的引物,用同样的方法得出了同样的结



果,说明寄生疫霉菌内的不同菌株(两个变种)具有相同的 DNA 结构,并认为 Erwin 提出的以寄生疫霉菌烟草专化型(*Phytophthora parasitica* f. sp. *nicotianae*)作为烟草黑胫病菌的名称具有一定的合理性。

以上试验从分子水平上比较了烟草疫霉(*Phytophthora nicotianae*)和寄生疫霉(*Phytophthora parasitica*)以及寄生疫霉寄生变种(*Phytophthora parasitica* var. *parasitica*)与寄生疫霉菌烟草变种(*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*)之间的 DNA 结构,从而证实了烟草疫霉和寄生疫霉的 DNA 是同质的,两个变种之间在 DNA 结构上没有区别,种内不同致病类型的菌株具有相同的 DNA 遗传结构。

四、观点讨论

综合众多研究结果,我们可以确认,烟草疫霉(*Phytophthora nicotianae* Breda de Haan)和寄生疫霉(*Phytophthora parasitica* Dastur)无论在形态结构上,还是在分子水平上,均为同一个种,属于同物异名种,而且从形态特征和 DNA 结构上均无法划分 2 个变种。根据国际植物命名法规中的优先权原则,以烟草疫霉(*Phytophthora nicotianae*)作为种名较为妥当,而寄生疫霉(*Phytophthora parasitica*)可以视为异名。

尽管烟草黑胫病菌不存在绝对寄主专化性,无论是通过人工创伤接种还是在自然条件下,烟草都不是烟草黑胫病菌的唯一寄主,但在自然条件下其寄主仍绝对以烟草为主。因而,根据国际植物命名法规及其寄主仍绝对以烟草为主的特点,用烟草疫霉菌烟草专化型(*Phytophthora nicotianae* Breda de Haan f. sp. *nicotianae*)作为烟草黑胫病菌的名称似乎合法又合理。

第二节 烟草疫霉菌的地位与危害

一、分类地位

烟草疫霉菌在安斯沃思(Ainsworth, 1973)的分类系统中隶属于鞭毛菌亚门(Mastigomycotina)卵菌纲(Oomycetes)霜霉目(Peronosporales)腐霉科(Pythiaceae)疫霉属(*Phytophthora*)。1995 年 12 月出版的《安比氏菌物辞典》第 8 版[Ainsworth & Bisby's *Dictionary of the Fungi* (8th edition) C. A. B. I.]采用了卡瓦尼-史密斯(Cavalier-Smith, 1981, 1988)的生物八界分类系统,将安斯沃思分类系统中的卵菌纲归入藻物界(Chromista, 也称假菌界)卵菌门(Oomycota)(Hawksworth, 1995)。

在属以下的分类地位上,Waterhouse (1963, 1970)、Newhook 等(1978)、Ho (1981)、Stamps 等(1990)主要依据孢子囊的形态、大小、脱落性、孢囊柄、乳突、排孢孔、孢囊梗、雄器等性状特征将其划归疫霉属第 II 组。

因此,烟草疫霉菌目前的分类地位为藻物界卵菌门卵菌纲腐霉目(Pythiales)腐霉科疫霉属第 II 组。



种的鉴别特征:孢子囊乳突明显,孢子囊脱落具短柄,孢子囊多近球形,不对称孢子囊较常见,异宗配合,藏卵器较小,雄器围生,最高生长温度大于 35℃。

二、分布与危害机制

(一) 分布范围

烟草疫霉菌分布于全世界范围,特别是温带、热带和亚热带地区。

(二) 危害程度

烟草疫霉菌可以在烟草的任何生育阶段侵染危害,但主要危害大田期烟草。苗期发病往往造成烟草成片死亡,呈猝倒状;大田期发病则会造成整个烟株突然凋萎并伴有根部或茎基部变黑症状,常造成无法挽救的损失。

(三) 致病机制

据陈瑞泰(1989)的研究结果表明,烟草植株病斑部位的导管内部出现了因病菌分泌的毒素使寄主细胞分解而产生的胶块和木栓,阻塞了根部水分的上升,从而产生凋萎现象。病菌分泌物可能是多元半乳糖醛酶,这种酶可以分解寄主细胞的中胶层和导管壁,产生果胶产物碎块,然后形成胶块。Wolf(1933,1954)的研究结果表明,在培养滤液及病组织中存在烟草疫霉菌毒素,抽提培养过烟草疫霉菌的培养基和烟草病组织所得的抽提物可引起健康叶片和烟苗萎蔫,并证实这种毒素具有热稳定、不挥发、能渗析、可以被炭吸附等特性。陈瑞泰(1989)、王智发(1996)等的研究均认为,引起烟草黑胫病的疫霉菌分泌的毒素为糖蛋白。

Duniway(1983)研究认为,就绝大多数疫霉而言,从无性繁殖到更多次的无性繁殖的循环往复在疫霉菌所致病害的流行中起重要作用,游动孢子在再侵染中起主要作用。根据感病品种接种试验,游动孢子的侵入并不需要伤口。游动孢子受弱电流吸引聚集在根表面,以根冠及伤口处最多。它们在 3 h 内发芽并直接穿入表皮,产生的菌丝迅速进入皮层细胞内部或居于细胞之间,6 h 内到达中柱。

三、观点讨论

作者在烟草大田生产中开展的引起烟草黑胫病的烟草疫霉菌抗性品种鉴定以及致病力分化研究试验中均发现,在水分充足的情况下,无论寄主烟草是敏感品种还是抗性品种,都会严重发病。这与 McCarter(1967)报道的完全一致。



第二章 烟草疫霉菌的生物学

第一节 基本研究方法

一、采集、分离与纯化

(一) 标样的采集

从主产烟区采集发生烟草黑胫病的症状较为典型的烟株,带回实验室后分离纯化烟草疫霉菌,并建立相应的纯净的单游动孢子株。

(二) 烟草疫霉菌的分离纯化

将病株茎秆用自来水洗净、晾干,从病健交界处取 5 mm × 5 mm 大小的髓部组织块,移入含抗生素的选择性利马豆(LBA)培养基上,每皿(直径 9 cm)均匀放置 5 块组织,置于 25℃ 培养箱,黑暗条件下培养 3 d。待菌落形成后,用灭菌解剖刀从菌落边缘切取 2 mm × 2 mm 大小的菌丝块在选择性培养基上转移一次,每皿 4 ~ 5 块,25℃、黑暗条件下培养 3 d。然后从菌落边缘切取 2 mm × 2 mm 大小的菌丝块,转移至盛有 LBA 的试管斜面上,25℃、黑暗条件下培养 7 d 后,低温下保存备用。供试菌株的编号、寄主植物及采集地可以按照表 2-1 列出。

表 2-1 供试菌株的编号、寄主植物及采集地

Table 2-1 Number, host plants and localities of the tested isolates

菌株编号	寄主植物及品种	采集地

二、培养基的配制

(一) 利马豆(LBA)培养基

取 60 g 利马豆粉,加入去离子水 1000 mL,在 60℃ 恒温水浴锅内加热 1 h 后,用 4 层纱布过滤去渣,取滤液用去离子水定容到 1000 mL,加入琼脂 20 g,在微波炉内加热至琼脂完全熔化后,趁热分装。

(二) 10% 的 V₆C 培养液(基)

把番茄、胡萝卜、黄瓜、莴苣、芹菜、菠菜 6 种蔬菜分别用组织捣碎机捣碎成浆状后,用双



层纱布过滤去渣,准确量取滤液按比例混合,即为 V_6 原汁。取 V_6 原汁 10 mL,加入 0.02 g CaCO_3 后,加入去离子水 90 mL,即为 10% 的 $V_6\text{C}$ 培养液。在 100 mL 10% 的 $V_6\text{C}$ 培养液中加入琼脂粉 2 g 即为 10% 的 $V_6\text{C}$ 培养基。

(三) 0.2% V_6 水琼脂培养基

取 10% $V_6\text{C}$ 培养液的上清液 2 mL,加去离子水 98 mL,琼脂粉 1.8 g,混匀。

以上培养基(液)均在 121°C 下灭菌 20 min。

(四) 含药培养基

参照王革(1996)的方法,但略有修改。具体配制方法介绍如下:

先将 90% 的甲霜灵原药用少量丙酮溶解,再用灭菌水配成浓度为 $5000\ \mu\text{g/mL}$ 及 $100\ \mu\text{g/mL}$ 的母液,置于 4°C 冰箱备用。测定时,根据 LBA 的量,用微量加样器吸取一定量的药剂母液加入融化后并冷却到 50°C 左右的 LBA 培养基中,充分混匀,分别配成含甲霜灵终浓度为 0.000, 0.0025, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 $\mu\text{g/mL}$ 的含药培养基。

(五) 选择性培养基

先把青霉素(PN)、利福平(RFP)、五氯硝基苯(PCNB)三种抗生素或化学药剂配成 $20000\ \mu\text{g/mL}$ 的母液,然后在 LBA 培养基融化后并冷却到 50°C 左右时加入药剂母液,充分摇匀,每 200 mL LBA 培养基中加入青霉素、利福平、五氯硝基苯母液各 0.5 mL,即配成含各药剂终浓度均为 $50\ \mu\text{g/mL}$ 的选择性培养基。

(六) L-色氨酸培养基

参照郑小波(1990)的方法,具体配制方法介绍如下:

将 β -sitosterol 先溶于少量的二氯甲烷(CH_2Cl_2)中,然后加入 10% 的 $V_6\text{C}$ 培养基中搅匀,再加入 CaCl_2 搅匀,分装于三角瓶中, 121°C 下灭菌 20 min,备用。再把 L-色氨酸和维生素 B_1 混合溶于少量水中, 121°C 下单独灭菌 20 min,在使用前按比例临时加入备用的培养基中。L-色氨酸培养基的标准配方见表 2-2。

表 2-2 L-色氨酸培养基的标准配方

Table 2-2 The standard formula of L-tryptophan medium

主要成分	含量	主要成分	含量
β -sitosterol	30 mg	L-色氨酸	20 mg
10% 的 $V_6\text{C}$ 培养基	1000 mL	维生素 B_1	1 mg
CaCl_2	100 mg	琼脂粉	20 g

三、土壤浸出液的制取

参照郑小波(1997)的方法,具体方法介绍如下:

取肥沃的菜园表层土壤 300 g,加自来水 500 ~ 700 mL,搅匀后静置数小时,去掉浮于水面的残渣。先用滤纸滤去上清液中的土壤颗粒,再用细菌滤器(滤膜孔径 $0.25\ \mu\text{m}$)过滤两次,置于 4°C 冰箱中保存备用。