

## 烟草黑胫病菌生理小种判别及鉴别寄主的筛选

丁 昂<sup>1</sup>, 谷从纪<sup>1</sup>, 衣盛月<sup>1</sup>, 阮亚男<sup>1</sup>, 张奇瑞<sup>1</sup>, 夏振远<sup>2</sup>, 陈泽斌<sup>1\*</sup>

(1. 昆明学院 农学与生命科学学院, 云南 昆明 650214;

2. 云南省烟草农业科学研究院, 云南 昆明 650021)

**摘要:** 为了判别烟草黑胫病菌生理小种并对鉴别寄主进行筛选, 采用菌丝块无创伤贴接法判别 10 个不同来源的烟草黑胫病菌对 NC1071、L8、Florida301、小黄金 1025 等 4 个鉴别品种的致病力。通过调查烟草黑胫病菌侵染鉴别寄主情况, 将这 10 株来源不同的黑胫病菌划分为两类, 其中 6 个菌株属于 1 号生理小种, 4 个菌株属于 0 号生理小种。用红花大金元、NC82、KRK26 和 K326 等 4 个烟草品种通过菌丝块无创伤贴接法进行筛选。结果表明, 红花大金元可以代替小黄金 1025 作为感病品种, 用于鉴定黑胫病菌生理小种的类型。

**关键词:** 烟草; 黑胫病菌; 生理小种; 鉴别寄主

**中图分类号:** S572 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-5639 (2021) 06-0006-06

**DOI:** 10.14091/j.cnki.kmxyxb.2021.06.002

### Identification of Physiological Races of *Phytophthora Parasitica* var. *Nicotianae* and Screening of Differential Hosts

DING Ang<sup>1</sup>, GU Congji<sup>1</sup>, YI Shengyue<sup>1</sup>, RUAN Yanan<sup>1</sup>, ZHANG Qirui<sup>1</sup>, XIA Zhenyuan<sup>2</sup>, CHEN Zebin<sup>1\*</sup>

(1. School of Agriculture and Life Sciences, Kunming University, Kunming, Yunnan, China 650214;

2. Yunnan Academy of Tobacco Agricultural Sciences, Kunming, Yunnan, China 650021)

**Abstract:** In order to identify the physiological races of *Phytophthora Parasitica* var. *nicotianae* and to screen the identified hosts, the mycelial block non-traumatic attachment method was used to determine the pathogenicity of 10 strains from different sources to four different varieties, including NC1071, L8, Florida301, and Xiaohuangjin 1025. After studying ten pathogenic strain of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* from different areas, they were divided into two categories, of which 6 strains belonged to Races 1 and 4 strains belonged to Races 0. Four tobacco varieties Honghua Dajinyuan, NC82, KRK26 and K326 were screened by the mycelial block non-traumatic attachment method. The results show that Honghua Dajinyuan can replace Xiaohuangjin 1025 as a susceptible variety to identify the physiological races of black shank.

**Key words:** tobacco; black shank disease; physiological races; differential hosts

烟草黑胫病是烤烟生产过程中的主要真菌性病害之一, 且分布非常广泛<sup>[1]</sup>, 其病原菌烟草寄生疫霉 (*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*) 对烟草的危害极大, 会导致无法挽回的经济损失。而研究烟草黑胫病菌生理小种的判别及鉴别寄主的筛选

有助于明确黑胫病原生分情况, 进而为烟草黑胫病的防治提供理论依据。1896 年, 烟草黑胫病首次在印尼爪哇烟草中发现<sup>[2]</sup>; 1950 年, 在我国黄淮烟区也发现了该病, 之后蔓延至其他烟区<sup>[3-8]</sup>。随着分子生物学技术的发展及其研究的深

收稿日期: 2021-08-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (42067009); 云南省教育厅科学研究基金项目 (2021Y732, 2020Y0478, 2020Y0473)。

作者简介: 丁昂 (1997—), 男, 江苏徐州人, 在读硕士研究生, 主要从事烟草黑胫病病原生理分化研究。

\* 通信作者: 陈泽斌 (1985—), 男, 云南昆明人, 副教授, 博士, 主要从事农业微生物学研究, E-mail: zbchenku@163.com.

入, 愈来愈多研究者发现烟草黑胫病的致病性并不是相对稳定的. 例如: Lucas<sup>[9]</sup>报道了一个弱致病力菌系, 随后有研究者也陆续发现烟草黑胫病菌在致病力上存在一定的差异; 1957 年以来, 国内外专家学者<sup>[6]</sup>开始对烟草黑胫病的生理专化性进行研究; 1962 年, Apple<sup>[10]</sup>把对 *N. plumbaginitifolia* 无致病力的菌系定为 0 号小种, 高度致病力的菌系定为 1 号小种; 其他研究者发现, 烟草黑胫病菌 0 号小种对 L8、NC1071、*N. nudicaulis*、*N. plumbaginifolia* 和 K326 无致病力或仅有弱致病力, 但对小黄金 1025 具有一定致病力. 此外, 我国生理小种的分布研究开始于 20 世纪 80 年代, 0 号生理小种主要分布在我国的山东省、贵州省、云南省、湖北省、河南省、陕西省、安徽省、福建省、湖南省、四川省, 1 号生理小种主要分布在我国的辽宁省<sup>[11]</sup>. 1973 年, Lamprecht 等<sup>[12]</sup>采用类似方法, 以 Delcrest202 烟草品种接种后的不同反应, 在南非鉴定出 2 号小种; 1978 年, McIntyre 等<sup>[13]</sup>选用几种特定烟草品种并结合某些培养性状和生理生化特性, 在美国将康涅狄格菌系 0 号和 1 号生理小种区分开来, 定为 3 号生理小种. 截至目前, 烟草疫霉菌在全世界已发现的生理种有 0、1、2、3 号<sup>[14]</sup>. 此外, 李梅云<sup>[15]</sup>、李斌等<sup>[16]</sup>、苗圃等<sup>[17]</sup>主要通过 TIZ 颜色反应、TTC 颜色反应和鉴别寄主法鉴别黑胫病菌生理小种类型. 而本研究拟采用菌丝块无创伤贴接法来判别黑胫病菌生理小种类型及致病性, 旨在为抗病育种、栽培和植物保护等方面控制该病害提供参考依据.

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌种

烟草黑胫病菌由云南省烟草农业科学研究院微生物学实验室提供, 编号 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 分别代表菌株 QJS804 (分离自曲靖市师宗县五龙乡样品)、BSSDD6 (分离自保山市施甸县万兴乡样品)、CXSL (分离自楚雄州双柏县大庄样品)、DLXY (分离自大理州祥云县禾甸镇样品)、CXLX (分离自楚雄州禄丰县仁兴镇样品)、YXJHD (分离自玉溪市江川区九溪镇样品)、YX-HN06 (分离自玉溪市红塔区高仓镇样品)、DC-WS03 (分离自迪庆州香格里拉市上江乡样品)、eXSBD40 (分离自昭通市巧家县老店镇样品)、gh2

(分离自临沧市耿马县勐永镇样品).

### 1.2 供试品种

鉴别寄主: L8、NC1071、Florida301、小黄金 1025; 对照烤烟品种: 红花大金元、K326、KRK26、NC82. 以上烤烟品种均由云南省烟草农业科学研究院提供.

### 1.3 培养基制备

称取燕麦片 30 g, 加入 600 mL 水, 沸水浴上加热并不断搅拌 1 h, 双层纱布过滤, 弃掉过滤物, 滤液备用. 称取琼脂粉 17~20 g 置于 1 000 mL 烧杯中, 加入 200 mL 水, 玻璃棒搅拌均匀, 与滤液充分混匀, 加水补足 1 000 mL, 趁热分装灭菌, 121 °C 高压蒸气灭菌 20 min.

### 1.4 烟苗准备

将 L8、NC1071、Florida301、小黄金 1025、红花大金元、K326、KRK26、NC82 这 8 个品种放入漂浮盘进行育苗, 在播种 1 个月时剪去叶片的 1/2 以上, 7 d 后进行第 2 次剪叶, 剪叶 7 d 后移栽至温室大棚培养.

### 1.5 黑胫病菌接种体制备

挑取甘油管中保存的 10 个菌株各 1 环, 接种在燕麦培养基平板中间, 置于 28 °C 恒温培养箱培养 5 d, 将活化的黑胫病菌置于燕麦培养基中, 每个菌株接种 5 皿, 在 28 °C 培养箱中培养 7 d.

### 1.6 烟苗移栽

将烟苗移栽至装有栽培土的花盆中, 并放置于温室大棚中, 定期浇水. 设置 8 个处理, 每个处理 6 株, 3 次重复.

### 1.7 黑胫病菌接种

将燕麦培养基中的黑胫病菌菌丝用无菌解剖刀分割成 4 mm × 4 mm 小块, 将菌丝块贴接于烟苗的茎基部, 菌丝块用脱脂棉包裹住, 并向脱脂棉滴加少量蒸馏水, 使其完全湿润, 以保证菌丝体正常生长, 并设置培养基块接种作对照<sup>[18]</sup>.

### 1.8 病情调查

接种 3 d 后, 以株为单位调查并记录各烟株发病情况, 共调查 14 d. 病害严重度分级及调查方法参照国标《烟草病虫害分级及调查方法》(GB/T 23222—2008)<sup>[19]</sup>进行.

### 1.9 生理小种鉴别

通过分析各鉴别寄主的发病情况, 计算病情指数 (简称病指), 公式如下:

病情指数 =  $\frac{\sum (\text{各级病株数} \times \text{该病级数})}{\text{调查总株数} \times \text{最高病级数}} \times 100.$

根据烟草品种抗病性鉴定标准<sup>[20]</sup>判断抗感性,其中:高抗或免疫(HR),病指为0;抗病(R),病指为0.1~20;中抗(MR),病指为20.1~40;中感(MS),病指为40.1~60;感病(S),病指为60.1~80;高感(HS),病指为80.1~100.黑胫病菌生理小种的划分参照表1.

表 1 不同生理小种在鉴别寄主上的反应				
寄主名称	0 号小种	1 号小种	2 号小种	3 号小种
NC1071	R	S	-	R
L8	R	S	R	MR
Florida301	R	R	R	R
小黄金 1025	S	S	S	S

## 2 结果与分析

### 2.1 黑胫病菌侵染不同品种烟株的发病情况

将鉴别寄主 L8、小黄金 1025、Florida301、NC1071 被不同黑胫病菌侵染后的致病情况列入表 2. 由表 2 可看出,鉴别寄主被黑胫病菌侵染后分别表现出不同的感病情况,其中:L8 对编号为 1、2、3、4、5、8、9 的黑胫病菌表现为感病,对编号为 6、7、10 的黑胫病菌表现为抗病;小黄金 1025 对 10 个黑胫病菌全部表现为感病;Florida301 除对编号为 9 的黑胫病菌表现为感病外,对其他 9 个黑胫病菌表现为抗病;NC1071 对编号为 1、2、3、4、5、8 的黑胫病菌表现为感病,对编号为 6、7、9、10 的黑胫病菌表现为抗病.

表 2 鉴别寄主被不同黑胫病菌侵染后的致病情况

品种	菌株	病级						病指	抗感
		9	7	5	3	1	0		
L8	1	3	0	1	1	1	0	66.67	S
	2	3	0	1	1	1	0	66.67	S
	3	2	0	1	0	0	3	42.59	S
	4	2	0	1	1	1	1	50.00	S
	5	5	0	0	0	0	1	83.33	S
	6	2	0	0	0	0	4	33.33	R
	7	2	0	0	1	1	3	34.92	R
	8	5	0	0	1	1	0	77.78	S
	9	4	0	0	2	2	0	61.11	S
	10	1	0	1	2	2	2	30.56	R
小黄金 1025	1	3	0	0	1	0	2	55.56	S
	2	5	0	0	0	0	1	83.33	S
	3	2	1	1	1	0	1	61.11	S
	4	1	1	1	3	0	1	47.62	S
	5	5	0	0	0	0	1	83.33	S
	6	4	0	0	0	0	2	66.67	S
	7	5	0	0	0	0	1	83.33	S
	8	5	0	0	0	0	1	83.33	S
	9	5	0	0	0	0	1	83.33	S
	10	3	1	0	0	0	2	62.96	S
Florida301	1	0	0	0	0	0	6	0.00	R
	2	1	0	0	0	0	5	16.67	R
	3	0	0	0	0	0	6	0.00	R
	4	1	0	0	1	2	2	25.93	R
	5	1	0	1	0	0	4	25.93	R
	6	0	0	0	0	0	6	0.00	R
	7	1	0	0	0	0	5	16.67	R
	8	2	0	0	1	0	3	38.89	R
	9	2	0	0	2	0	2	44.44	S
	10	0	3	0	0	0	3	38.89	R

续表 2									
品种	菌株	病级						病指	抗感
		9	7	5	3	1	0		
NC1071	1	5	0	1	0	0	1	79.37	S
	2	4	0	0	0	0	2	66.67	S
	3	3	0	1	0	0	2	59.26	S
	4	3	0	1	2	1	0	61.90	S
	5	3	1	0	0	1	1	64.81	S
	6	1	0	0	1	2	2	25.93	R
	7	1	0	1	2	0	2	37.04	R
	8	4	0	0	0	0	2	66.67	S
	9	2	0	0	0	0	2	50.00	R
	10	0	0	0	3	0	3	16.67	R

2.2 黑胫病菌生理小种的判别

不同黑胫病菌对鉴别品种的抗感性统计列入表 3。由表 3 可知, 10 个黑胫病菌鉴定为 2 个不同的生理小种, 其中 6 个菌株为 1 号生理小种, 4 个菌株为 0 号生理小种。属于黑胫病 1 号生理小种的菌株有: DCWS03、CXLT、DLXY、CXSL、QJS804、BSSDD6, 属于 0 号生理小种的有 gh2、eXSBD40、YXHN06、YXJHD。

表 3 不同黑胫病菌对鉴别品种的抗感性统计

菌株		鉴别寄主抗感性				生理小种
编号	简称	L8	小黄金 1025	Florida301	NC1071	
1	QJS804	S	S	R	S	1
2	BSSDD6	S	S	R	S	1
3	CXSL	S	S	R	S	1
4	DLXY	S	S	R	S	1
5	CXLT	S	S	R	S	1
6	YXJHD	R	S	R	R	0
7	YXHN06	R	S	R	R	0
8	DCWS03	S	S	R	S	1
9	eXSBD40	R	S	R	R	0
10	gh2	R	S	R	R	0

2.3 黑胫病菌对不同栽培品种烟株的发病情况

栽培品种 KRK26、红花大金元、NC82、K326 在不同黑胫病菌侵染下的致病情况列入表 4。由表 4 可看出, 不同栽培品种被黑胫病菌侵染后分别表现出不同的感病情况, 其中: KRK26 对编号为 1、5、6、8、9、10 的黑胫病菌表现为感病, 对编号为 2、3、4、7 的黑胫病菌表现为抗病; 红花大金元对 10 个黑胫病菌全部表现为感病; NC82 对编号为 1、3、6、7、8、10 的黑胫病菌表现为感病, 对编号为 2、4、5、9 的黑胫病菌表现为抗病; K326 对编号为 1、2、5、8、9、10 的黑胫病菌表现为感病, 对编号为 3、4、6、7 的黑胫病菌表现为抗病。

2.4 栽培品种中黑胫病菌鉴别寄主的筛选

通过对比表 2 和表 4 栽培品种和鉴别寄主被黑胫病菌侵染后的感病情况, 发现栽培品种红花大金元与鉴别寄主小黄金 1025 的感病情况一致, 因此可将红花大金元作为感病品种用于黑胫病菌 0 号和 1 号生理小种的鉴定。

3 讨论与结论

3.1 讨论

作为判别黑胫病菌生理小种类别的鉴别寄主需要具备的条件有: 鉴别能力、抗感分明、反应灵敏稳定、重复性好<sup>[21]</sup>。根据国内外鉴定黑胫病菌生理小种类型的试验来看, 本试验选用的 4 个鉴别寄主 L8、小黄金 1025、Florida301、NC1071 具有明显的鉴别能力, 从其发病情况可以直观地判别黑胫病菌生理小种类型, 满足试验需求。

表 4 不同黑胫病菌在栽培品种上的致病情况

品种	菌株	病级						病指	抗感
		9	7	5	3	1	0		
KRK26	1	3	0	0	2	0	1	61.11	S
	2	2	0	0	1	0	3	38.89	R
	3	0	0	0	0	0	6	0.00	R
	4	0	0	0	3	0	3	16.67	R
	5	4	0	0	1	0	1	72.22	S
	6	3	0	0	0	0	3	50.00	S
	7	1	0	0	0	1	4	18.52	R
	8	3	0	1	1	0	1	64.81	S
	9	2	1	2	0	1	0	66.67	S
	10	5	0	0	0	1	0	85.19	S
红花大金元	1	3	0	0	0	1	2	51.85	S
	2	5	0	0	0	1	0	85.19	S
	3	5	0	0	0	0	1	83.33	S
	4	5	0	0	0	0	1	83.33	S
	5	6	0	0	0	0	0	100.0	S
	6	4	1	0	0	0	1	79.63	S
	7	5	0	0	0	0	1	83.33	S
	8	5	0	0	0	0	0	100.00	S
	9	5	0	0	0	0	1	83.33	S
	10	5	0	0	0	0	1	83.33	S
NC82	1	5	0	0	0	0	1	83.33	S
	2	2	0	0	1	0	3	38.89	R
	3	2	0	1	0	0	3	42.59	S
	4	1	0	1	2	0	2	37.04	R
	5	1	0	0	0	1	4	18.52	R
	6	3	0	0	1	0	2	55.56	S
	7	4	0	0	0	0	2	66.67	S
	8	5	0	0	0	0	1	83.33	S
	9	2	0	0	0	1	3	35.19	R
	10	3	0	0	0	1	2	51.85	S
K326	1	3	0	0	1	1	1	57.41	S
	2	3	0	2	1	0	0	74.07	S
	3	2	0	1	0	2	2	39.68	R
	4	1	0	1	2	1	1	38.89	R
	5	4	0	1	0	0	1	75.93	S
	6	2	0	1	0	0	4	36.51	R
	7	1	1	0	0	3	1	35.19	R
	8	3	0	0	0	1	2	51.85	S
	9	2	1	1	0	2	0	59.26	S
	10	4	0	0	1	1	0	74.07	S

分析不同黑胫病菌侵染烟草栽培品种后的感病情况，发现 KRK26 对编号为 6、9、10 的 0 号生理小种和编号为 1、5、8 的 1 号生理小种均表现为感病，对编号为 7 的 0 号生理小种和编号为 2、3、4 的 1 号生理小种均表现为抗病。NC82 及 K326 在不同黑胫病菌侵染后均呈现与 KRK26 一样的发病情况，因此不可将这 3 个栽培品种作为鉴别寄主。

通过对比表 1、表 2 和表 3 可以发现，鉴别寄主 L8 和 Florida301 对编号为 9 的 0 号黑胫病菌生理小种表现为感病，该结论与黑胫病菌生理小种的划分结果（参照表 1）不符。由此可见，菌丝块无创伤贴接法可能受外界条件影响，致使烟株表现出不同的感病情况。例如 K326、NC82 会对不同类型的生理小种表现出不同的感抗性，因此不同黑胫病

菌生理小种侵染这两个抗病品种后会表现出不同的感病情况。近年来, 分子生物学方法极大地帮助了生理小种的鉴定<sup>[22]</sup>。因此, 有必要将分子生物学与传统方法相结合, 才能对烟草黑胫病菌生理小种进行更加深入的研究。

### 3.2 结论

采用菌丝块无创伤贴接法对 10 个黑胫病菌进行生理小种判别结果表明, 6 个菌株属于 1 号生理小种, 4 个菌株属于 0 号生理小种。栽培烤烟品种 KRK26、NC82、K326 在被 10 个不同黑胫病菌侵染后均未呈现出感病症状, 而栽培品种红花大金元与鉴别寄主小黄金 1025 的发病情况一致, 因此可以将红花大金元用于黑胫病菌 0 号和 1 号生理小种的鉴定。

### 【参考文献】

- [1] 高文华, 李江美. 烟草黑胫病防治研究进展 [J]. 热带农业科技, 2020, 43 (1): 50–54.
- [2] 赵辉, 王喜英, 刘国权, 等. 烟草黑胫病发生因素及综合防治研究进展 [J]. 湖南农业科学, 2020 (11): 99–103.
- [3] 方敦煌, 肖炳光, 焦芳婵, 等. 烟草黑胫病抗性鉴定研究现状与展望 [J]. 中国烟草学报, 2018, 24 (3): 130–135.
- [4] 高亚星. 烟草黑胫病防治技术研究 [D]. 贵阳: 贵州大学, 2017.
- [5] 巢进, 张战泓, 田峰, 等. 烟草黑胫病防控技术研究进展 [J]. 湖南农业科学, 2016 (8): 120–122.
- [6] 张凯, 谢利丽, 武云杰, 等. 烟草黑胫病的发生及综合防治研究进展 [J]. 中国农业科技导报, 2015, 17 (4): 62–70.
- [7] 谢永辉, 张永贵, 朱利全, 等. 烟草黑胫病综合防治研究进展 [J]. 生物技术进展, 2015 (1): 41–46.
- [8] 赵百英. 烟草黑胫病研究进展 [J]. 乡村科技, 2016 (17): 84–85.
- [9] SHEW H D, LUCAS G B. Compendium of tobacco diseases [M]. Saint Paul: American Phytopathological Society Press, 1991.
- [10] APPLE J L. Physiological specialization within *Phytophthora parasitica* var. *Nicotianae* [J]. Phytopathology, 1962, 52: 351–354.
- [11] 朱贤朝, 郭振业, 刘保安, 等. 我国烟草黑胫病菌生理小种研究初报 [J]. 中国烟草, 1987 (4): 1–3.
- [12] LAMPRECHT M R. Breeding flue-cured tobacco resistant to South African black shank [J]. Agriplant, 1973, 5: 67–72.
- [13] MCINTYRE J L, TAYLOR G S. Race 3 of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* [J]. Phytopathology, 1978, 68: 35–38.
- [14] GALLUP C A, MCCORKLE K L, IVORS K L. Characterization of the black shank pathogen, *Phytophthora nicotianae*, across north carolina tobacco production areas [J]. Plant Disease, 2018, 102 (6): 1108–1114.
- [15] 李梅云. 云南省烟草疫霉生理小种的初步鉴定 [J]. 中国烟草科学, 2012, 33 (5): 54–59.
- [16] 李斌, 杨益芬, 龚国淑. 四川省烟草黑胫病菌生理小种的分离鉴定 [J]. 烟草科技, 2012 (10): 81–84.
- [17] 苗圃, 王海涛, 李淑君, 等. 河南省烟草黑胫病菌生理小种鉴定 [J]. 西北农业学报, 2013, 22 (10): 204–207.
- [18] 江艳, 桑维钧, 曾尔玲, 等. 烟草茎点病在贵州省的发生及病原鉴定 [J]. 江苏农业科学, 2018, 46 (10): 92–95.
- [19] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 烟草病虫害分级及调查方法: GB/T 23222—2008 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [20] 梁元存, 刘延荣, 王玉军, 等. 烟草黑胫病菌致病性分化和烟草品种的抗病性差异 [J]. 植物保护学报, 2003, 30 (2): 10–14.
- [21] 李梅云, 李永平. 病圃中烟草疫霉生理小种的鉴定 [J]. 云南农业大学学报 (自然科学), 2013, 28 (1): 21–26.
- [22] 易春霖, 郑静, 付寅冬, 等. 鉴定根肿菌 (*Plasmiodiophora brassicae*) 4 号生理小种的特异基因 PBRA\_000030 和 Novel00510 [J]. 四川农业大学学报, 2020, 38 (3): 305–310.