

不同浓度臭氧水对致病疫霉菌 *Phytophthora infestans* 孢子萌发抑制作用初报

徐常青¹, 魏建健², 曹克强³

(¹中国医学科学院药用植物研究所, 北京 100193; ²北京泰栢阳光科技发展有限公司, 北京 100086;

³河北农业大学植物保护学院, 河北保定 071001)

摘要:采用不同浓度臭氧水对致病疫霉菌 *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary 孢子囊萌发进行了试验, 结果表明: 臭氧水处理对孢子囊萌发的影响与臭氧水浓度密切相关, 以 9 mg/kg 臭氧水处理 1 min 可以抑制 95% 以上孢子囊萌发, 以 18 mg/kg 臭氧水处理 1 min 则 100% 抑制孢子囊萌发。无论在高浓度还是在低浓度条件下, 处理时间 1 min 或 2 min 对孢子囊萌发没有产生显著影响, 杀菌作用几乎是瞬间完成的。臭氧水处理孢子囊后导致孢子囊形态发生变化, 这种变化随时间延长变得更加明显。鉴于高浓度臭氧水对植物本身不产生毒害作用, 因此, 高浓度臭氧水在控制晚疫病方面显示出广阔的应用前景。

关键词: 臭氧水; 致病疫霉菌; *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bray; 孢子萌发

中图分类号: S3

文献标识码: A

论文编号: 2009-1346

Inhibitory Effects of Ozone Solution at Different Concentrations on Spore Germination of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary

Xu Changqing¹, Wei Jianjian², Cao Keqiang³

(¹Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193;

²Beijing TEPEC Technology Corporation, Beijing 100086; ³Agricultural University of Hebei, Baoding Hebei 071001)

Abstract: Inhibitory effects of ozone solution on spore germination of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary were tested and the morphological change of sporangia was observed under microscope. The results showed that spore germination rate was closely related to ozone concentrations. More than 95% spores were inhibited at concentration of 9 mg/kg and 100% spores were restrained at 18 mg/kg. While the treating time 1 minute and 2 minutes had no significant difference at both concentrations. Morphological deformation was found after 72 hours treated with high concentration of ozone solution. As ozone solution at high concentration has no toxicity to plants, it showed much potential to be used in controlling late blight in field.

Key words: ozone solution, late blight, *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bray, spore germination

0 引言

致病疫霉菌 *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary 是引起马铃薯和番茄晚疫病的致病菌, 对马铃薯和番茄生产具有毁灭作用, 19 世纪发生在爱尔兰的马铃薯晚疫病, 导致约 100 万人饥饿而死, 约 150 万人逃亡海外^[1-2]。目前全球每年因马铃薯晚疫病造成的损失在

100 亿美元以上, 给中国马铃薯生产造成的损失约在 10 亿美元左右^[3]。近年来, 由于马铃薯、番茄栽培面积不断扩大, 集约化程度越来越高, 为了防治晚疫病, 人们施用的化学药剂量逐年加大, 化学药剂的大量使用一方面容易导致病菌产生抗药性, 另外也容易导致产品中农药残留超标, 因此, 急需开拓新的防治方法^[4-6]。

基金项目: 科技部国际合作项目“全新农药替代技术开发、集成和应用研究”(2006DFB72260); 国家 863 计划项目“新型施药技术与农用器械”(2008AA100905)。

第一作者简介: 徐常青, 男, 1968 年出生, 博士后, 研究方向: 植物病虫害防治, 通信地址: 100193 北京市海淀区马连洼北路 151 号, Tel: 010-62899752, E-mail: cqxu@implad.ac.cn。

通讯作者: 魏建健, 高级工程师, 有机农业。E-mail: wjttepec@yahoo.com.cn。

收稿日期: 2009-07-01, **修回日期:** 2009-08-06。

已知臭氧具有良好杀菌作用,但气态臭氧在杀菌的同时对植物也造成伤害^[7]。医学与消毒领域通常用高浓度臭氧水代替化学杀菌剂进行杀菌^[8-10],而高浓度臭氧水在农业生产上的应用鲜有报道,该文尝试采用高浓度臭氧水杀灭致病疫霉菌孢子,为田间安全有效防治晚疫病提供依据。

1 材料与方法

1.1 孢子采集与孢悬液制备

作者于2008年10月番茄晚疫病发生高峰期,自北京市海淀区三元农业科技园大棚取番茄(品种为L402)病叶,以自来水和无菌水冲洗后,置人工气候箱保湿培养(23℃,RH 90%,12000 Lux),待病叶病健交界处产生灰白色霉层(孢子囊梗和孢子囊),以尖头镊子取下,置离心管内充分摇匀,12000转/分离心8 min,去上清液,加无菌水再次摇匀,离心,取沉淀的孢子囊,加无菌水稀释,镜检孢子浓度,稀释孢子浓度至10X物镜每视野含约100个孢子时备用。

1.2 高浓度臭氧水的制备

以自制电解式臭氧发生器电解纯净水产生臭氧水,开机10 min后产生的臭氧水浓度稳定在20 mg/kg,以带塞玻璃瓶取开机15 min后臭氧水,静置10 min,去除水中气泡待用。

1.3 高浓度臭氧水处理方法

臭氧水处理分3个水平,即0 mg/kg(无菌水)、9 mg/kg、18 mg/kg,每个处理3个重复,以带塞容量瓶盛放。处理方法为:分别吸取1 ml配置好的孢子液加入到含9 ml臭氧浓度分别为0 mg/kg、10 mg/kg、20 mg/kg的容量瓶中,立即摇匀,处理1 min和2 min,分别加入0.1%亚硫酸钠中止反应,取孢子液进行培养。

1.4 孢子培养

采用凹玻片水滴法,将各处理的孢子囊悬浮液用吸管滴在盖玻片上,加盖载玻片,置于带湿海绵的培养皿内,放入人工气候箱内进行暗培养,温度为23℃,RH90%,于48h、72h、96h、120h后在ZEISS Axio Imager A1显微镜下镜检孢子囊的萌发情况,每个处理计数5个视野中百个孢子中萌发的孢子数,依下式计算孢子囊的萌发率和萌发抑制率。

$$\text{孢子囊萌发率}(\%) = \frac{\text{孢子囊萌发个数}}{\text{观察总个数}} \times 100\%$$

$$\text{孢子囊萌发抑制率}(\%) = \frac{\text{孢子囊萌发个数}}{\text{观察总个数}} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 不同浓度臭氧水和不同处理时间对孢子萌发率的影响

以不同浓度臭氧水处理致病疫霉菌孢子,结果表明(表1),不同浓度臭氧水处理条件下,番茄晚疫病孢子萌发率明显不同,未经臭氧处理,孢子萌发率在20%左右,萌发率未随时间延长而加大。经臭氧水处理后,孢子萌发率明显降低,随着臭氧水浓度的提高,臭氧水对孢子萌发的抑制作用增强。与对照(0 mg/kg)相比,以9 mg/kg臭氧水处理,孢子萌发抑制率达95%以上,而以18 mg/kg臭氧水处理则完全抑制孢子萌发(图1),与对照相比差异达到极显著水平($p = 0.01$)。

高浓度臭氧水不同处理时间对致病疫霉菌孢子萌发的抑制作用差异不显著(图1)。虽然9 mg/kg臭氧水处理2 min比处理1 min孢子萌发率要低,但是两个处理水平之间差异不显著。以18 mg/kg臭氧水处理1 min已100%抑制孢子萌发,说明高浓度臭氧水的抑菌、杀菌作用几乎是瞬间完成的,延长处理时间并不能显著提高对孢子萌发率的抑制效果。

表1 不同浓度臭氧水处理对致病疫霉菌孢子萌发率的影响

臭氧浓度 (mg/kg)	处理时间 /min	孢子萌发率/%			
		48h	72h	96h	120h
0	1	20.2 ^a	20.6 ^a	20.2 ^a	19.6 ^a
	2	19.8 ^a	18.8 ^a	19.2 ^a	20.4 ^a
9	1	2.2 ^b	2.4 ^b	3.0 ^b	2.2 ^b
	2	1.2 ^b	1.6 ^b	1.8 ^b	1.6 ^b
18	1	0.0 ^b	0.0 ^b	0.0 ^b	0.0 ^b
	2	0.0 ^b	0.0 ^b	0.0 ^b	0.0 ^b

注:同一列中相同字母表示在 $p = 0.01$ 水平差异不显著。

2.2 不同浓度臭氧水处理对孢子形态结构的影响

用不同浓度臭氧水处理番茄晚疫病病菌孢子囊后,分别在48 h、72 h、96 h和120 h对孢子囊形态结构进行了观察,结果发现不同浓度的臭氧水处理对孢子囊结

构产生显著的致畸影响,这种影响随臭氧水浓度的增高和处理后等待的时间的延长而变得更加明显。

48 h: 无菌水(0 mg/kg)处理48 h(图2a),孢子囊直接萌发出芽管,但没有游动孢子产生。9 mg/kg臭氧

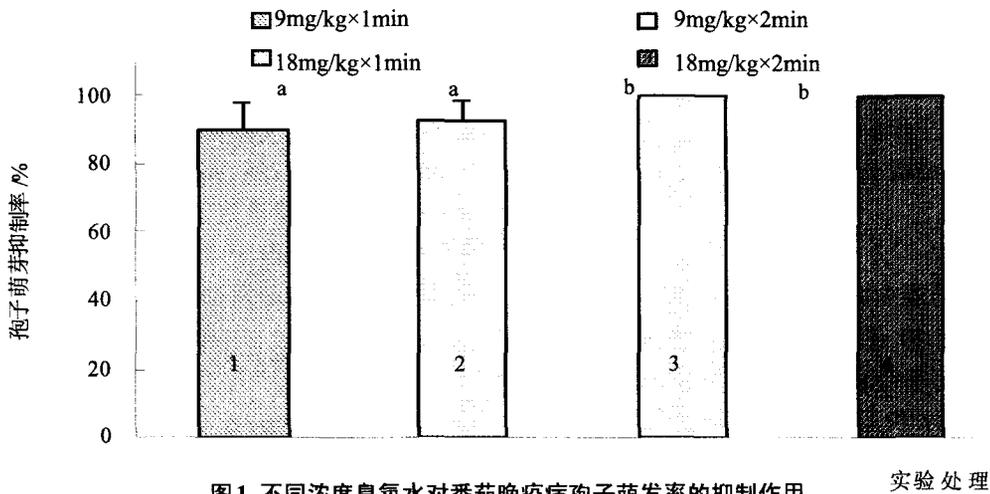


图1 不同浓度臭氧水对番茄晚疫病孢子萌发率的抑制作用

注:图中字母a、b表示在p=0.01水平差异显著性。

水处理 1 min(图 2b)和 18 mg/kg 臭氧水处理 1 min(图 2c)孢子囊外观未表现出明显差异,但是孢子囊没有萌发。

72 h: 无菌水处理 72 h(图 2d), 菌丝体生长更大, 孢子囊萌发率继续有增加。9 mg/kg 臭氧水处理(图 2e)的孢子囊细胞壁受损, 细胞质边缘部分出现空穴, 细胞质出现外溢。18 mg/kg 臭氧水处理(图 2f)细胞质边缘部分与 9 mg/kg 类似, 也出现空穴, 细胞膜受损, 细胞质出现收缩。依然没有出现孢子萌发。

96 h: 无菌水处理 96 h(图 2g), 菌丝体生长相互接

触, 孢子萌发率继续提高。9 mg/kg 臭氧水处理(图 2h)孢子囊细胞质受损更严重, 细胞内空穴扩大。18 mg/kg 臭氧水处理(图 2i)细胞受损加大, 细胞质边缘出现空隙, 而且细胞质内部出现小的空隙。

120 h: 无菌水处理 120 h(图 2j), 菌丝发育的更好, 具有活力的孢子多数已萌发。9 mg/kg 臭氧水处理(图 2k)孢子出现空壳现象较多, 多数孢子丧失萌芽活力。18 mg/kg 臭氧水处理(图 2l)细胞质内部出现较多的气泡形状, 孢子丧失萌芽活力。

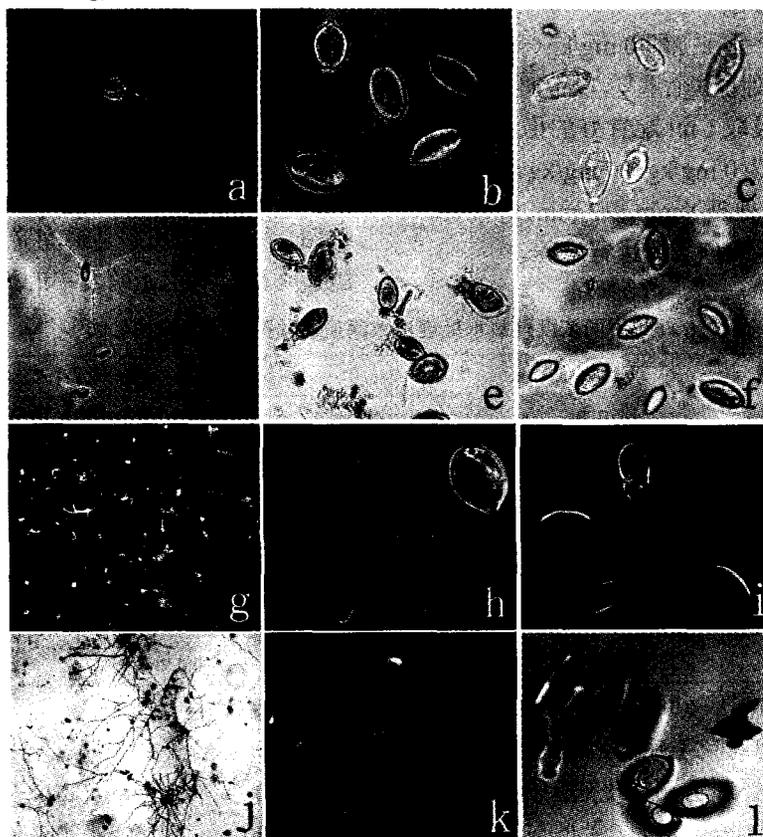


图2 高浓度臭氧水处理对致病疫霉菌孢子囊结构的影响

3 讨论

致病疫霉在低温条件下,孢子囊萌发产生游动孢子,该研究为了便于对不同处理后孢子形态进行观察,孢子萌发温度选择的是 23 ℃,在此条件下对照处理孢子囊萌发产生芽管,而经臭氧水处理的孢子囊很少产生芽管,另外孢子囊原生质出现了外溢和收缩,正是这种致畸作用,导致了孢子囊不能正常萌发。

与以往报道相同的是臭氧水的杀菌作用是瞬间完成的^[11]。试验中无论是在高浓度条件下还是在低浓度条件下,处理时间 1 min 和 2 min 之间没有表现出显著差异,这样充分说明臭氧水杀菌的速效性和低残留性。基于这种特点,臭氧水属于高效、环保的杀菌剂,符合未来社会发展的需要。

所用的臭氧水为该试验自行生产,前期的研究已解决了臭氧水快速产生和浓度检测,为将来臭氧水作为杀菌剂广泛使用奠定了基础。臭氧水作为消毒剂在医学上已广泛使用^[8-12],在农业上也仅限于用气态臭氧进行棚室消毒,而利用高浓度臭氧水作为杀菌剂使用还鲜有报道,该研究受时间所限,仅对致病疫霉进行了抑菌试验,对其他致病菌的抑制作用有待以后进一步研究。试验仅是在室内明确了臭氧水对番茄晚疫病菌的抑制作用,在田间是否能对病害表现出良好防治作用也有待于以后深入研究。

参考文献

- [1] Fry, W.E., S.B. Goodwin. Resurgence of the Irish potato famine fungus. *BioScience*, 1997, 47:363-371.
- [2] Andrivon, D. The origin of *Phytophthora infestans* populations present in Europe in the 1840s: A critical review of historical and scientific evidence. *Plant Pathology*, 1996, 45:1027-1035.
- [3] 张志铭,王仁贵. 中国马铃薯晚疫病研究进展和建议. *河北农业大学学报*, 2001, 24(2):4-10.
- [4] 康立功,许向阳,姜景彬,等. 番茄晚疫病病原菌生物学特性研究. *东北农业大学学报*, 2008, 39(2):168-170.
- [5] 余文贵,赵统敏,曹碚生,等. 番茄晚疫病菌研究进展. *江苏农业学报*, 2008, 24(4):516-521.
- [6] 姜晓艳,李海涛,张子君,等. 番茄晚疫病人工接种技术研究及抗病种质资源筛选. *沈阳农业大学学报*, 2008, 39(4):408-411.
- [7] 杨宇红,冯兰香,谢丙炎,等. 臭氧对蔬菜病害的防治效果. *中国蔬菜*, 2004, (4):41-42.
- [8] 代淑艳,张可畏,王慧明,等. 臭氧气体与臭氧水灭菌效果分析. *中国生物制品学杂志*, 2004, 17(5):320-321.
- [9] 肖彩霞,徐深,杨云东,等. 臭氧水对真菌杀灭作用的研究. *中国消毒学杂志*, 2004, 21(3):229-230.
- [10] 张桂祥,林修光. 臭氧水稳定性与杀菌性的试验观察. *现代预防医学*, 2007, 34(9):1772-1773.
- [11] 徐亚军,刘衡川,谷素英,等. 高浓度臭氧水稳定性及杀菌效果的试验观察. *中国消毒学杂志*, 2007, 24(1):29-32.
- [12] 冯兰香,谢丙炎,杨宇红. 臭氧—绿色食品蔬菜防病新技术. *蔬菜*, 2003, (9):23.