

培养馬鈴薯晚疫病菌的合成 溶液的进一步研究*

黃河 徐大雅 林傳光

(中国科学院微生物研究所, 北京)

在前一报告^[3]中,我們提出了一种能使馬鈴薯晚疫病菌 (*Phytophthora infestans*) 旺盛生长的較简单的液体合成培养基。本文对于培养基中以下几方面作进一步研究, (1) 有机酸、氮源和鈣这三个因素結合使用时的种类和需要量, (2) 硫胺素的需要量以及 (3) 有促进或抑制作用的一些其他有机物, 以期了解这一病菌的基本生理特性。

試驗所用的两个菌种, 除另有說明外, 一个是前文所用的生理 4 的两个分离系中的內蒙菌系, 另一个是从黑龙江分离的小种 1, 4。此外还用茄疫病菌 (*Phytophthora parasitica*) (分自北京茄果), 烟草黑胫病菌 (*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*) (为山东烟草研究所贈) 与黃瓜綿腐病菌 (*Pythium deBaryanum*) (为本所余永年同志贈), 进行了比較試驗。培养用的錐形瓶改用容量为 100 毫升的, 有机酸的中和改用 KOH。培养基的其他基础成分和制备过程以及結果的測定方法, 除另有說明外, 均与前一报告相同^[3]。

試驗結果

在馬鈴薯晚疫病菌的培养工作中, Payette 与 Perrault^[12], Henniger^[8] 和 Seidel^[14] 都应用了有机酸。Payette 与 Perrault 的培养基含有多钟有机酸。Henniger 用的是少量 (0.02%) 琥珀酸。Seidel 对于 5 种有机酸試驗的結果是琥珀酸比酒石酸好, 而苹果酸、柠檬酸和乳酸都比酒石酸差。我們以 Seidel 的工作为基础, 因为她所用的基础培养基比 Payette 与 Perrault 和 Henniger 的更为简单。当比較酒石酸和苹果酸时, 可以观察到后者在氯化鈣浓度提高到 0.1% 的条件下, 促进晚疫病菌生长的作用远比前者大 (表 1)。在我們的基础液上試过的有机酸中, 能比得上苹果酸的只有草酰乙酸 (表 2)。琥珀酸与延胡索酸在改变了的基础液中也表现了促进作用, 对此正在作进一步探究。

苹果酸浓度与晚疫病菌生长关系的試驗結果証明在 0.01 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 情况下, 以 0.02 M 为最适宜, 低于 0.01 M 則效应急剧下降, 高于 0.04 M 又有不良影响 (图 1)。

苹果酸与各种氮源相組合的試驗进行了两次。第一次先在含有各种氮源的溶液中培养三周, 取出重复的半数称重, 然后将另半数加苹果酸再培养二周称重 (图 2)。第二次一开始就加入苹果酸 (表 3)。两次試驗結果一致表明: (1) 无论有没有苹果酸, 晚疫病菌都很难利用硝态氮; (2) 在利用銨态氮时最需要苹果酸; (3) 苹果酸也提高某些氨基酸的利用率。

* 徐天宇和程汉清同志协助进行了部分工作。
本文于 1965 年 1 月 30 日收到。

表 1 酒石酸与苹果酸促进馬鈴薯晚疫病菌生长的效应

基础培养基*	有机酸**	氯化钙 浓度(%)	菌体干重(毫克)		最 终 pH	
			小 种 4	小 种 1,4	小 种 4	小 种 1,4
Seidel F ₈	酒石酸	0.01	24.3	35.7	5.6	5.0
Seidel F ₈	苹果酸	0.01	13.3	11.0	5.6	5.6
Seidel F ₈	酒石酸	0.1	71.1	48.7	4.6	4.6
Seidel F ₈	苹果酸	0.1	155.3	126.7	7.0	6.2
作 者	酒石酸铵	0.01	32.3	28.2	4.8	5.0
”	苹果酸	0.01	116.1	23.7	5.4	5.8
”	酒石酸铵	0.1	62.5	27.9	4.3	5.0
”	苹果酸	0.1	141.2	146.1	6.0	6.2

* Seidel F₈ 基础培养基的氮源为 0.1% NH₄NO₃, 作者的为 0.01 M (NH₄)₂SO₄, 其他成分和消毒方法也略有差异。

** 有机酸用量在 Seidel F₈ 培养基中为 0.5%, 在作者培养基中为 0.02 M。

表 2 草酰乙酸与苹果酸促进馬鈴薯晚疫病菌生长的效应

试 验	有 机 酸	菌体干重(毫克)		最 终 pH	
		小 种 4	小 种 1,4	小 种 4	小 种 1,4
1	无	0	0	5.4	5.4
	苹果酸	133.9	120.9	5.4	5.4
	草酰乙酸, Light 出品	140.7	165.5	5.8	6.2
2	苹果酸	141.2	146.1	6.0	6.2
	草酰乙酸, Light 出品	135.6	154.0	6.2	6.4

基础培养基中含 (NH₄)₂SO₄ 0.01 M。

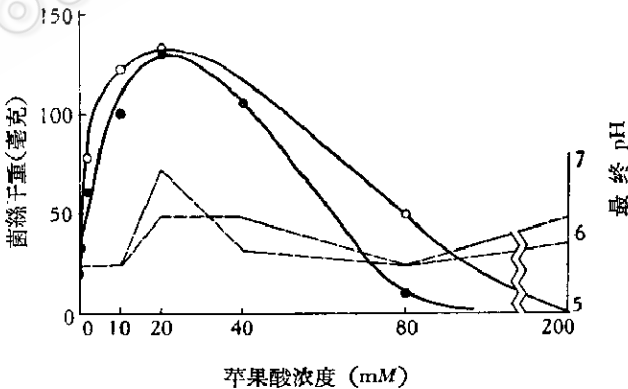


图 1 苹果酸浓度与晚疫病菌生长量的关系。

实线为菌体干重, 实点为小种 4 青海菌系, 圈点为小种 4 内蒙菌系, 虚线为培养基最终 pH。

值得注意的是, 凡加了苹果酸的培养基最终 pH 都有所提高。但是在铵态氮的培养基中加入 0.2% CaCO₃ 为缓冲剂并不象苹果酸那样有效地促进晚疫病菌的生长 (表 4)。

在文献上获得晚疫病菌较大量生长的合成培养基都含有钙素^[2,8,14]。Gaertner^[6] 还注意到在馬鈴薯煮液洋菜平面培养基中加入钙盐的良好效果。前文^[3]以及本文前面已经提到在铵态无机氮和有机酸培养液中的钙素需要量。现在我们证实了在以适宜的氨基酸为

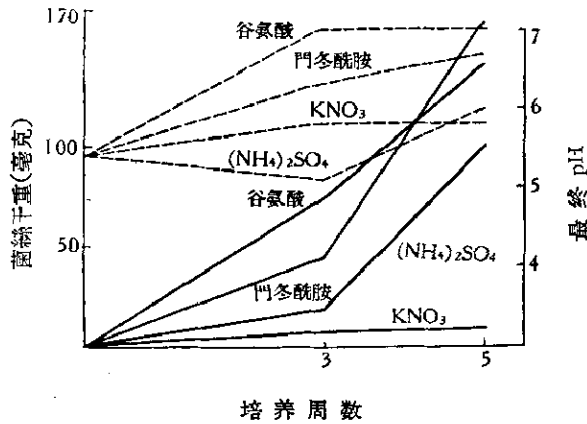


图2 苹果酸在各种氮源条件下对晚疫病菌生长的促进作用。(实验1)
实线为菌体干重,虚线为培养基最终 pH, 在三周后加入苹果酸。菌种为小种 1,4。

表3 苹果酸在各种氮源条件下对马铃薯晚疫病菌生长的促进作用 (试验2)

培 养 基		菌 体 干 重 (毫 克)		最 终 pH	
氮 源	苹 果 酸	小 种 4	小 种 1,4	小 种 4	小 种 1,4
KNO ₃	—	15.4	2.9	5.8	5.8
KNO ₃	+	23.3	9.6	6.2	6.2
门冬酰胺	—	63.3	45.6	6.0	6.2
”	+	178.5	118.5	6.2	7.0
谷 氨 酸	—	18.6	16.8	5.6	6.4
”	+	130.1	99.5	7.0	7.0
门冬氨酸	—	166.2	123.3	6.0	5.8
”	+	175.0	232.6	6.0	7.0

表4 在硫酸铵不加有机碳的培养基中加入 CaCO₃ 对于晚疫病菌生长的影响

0.2% CaCO ₃	菌 体 干 重 (毫 克)		最 终 pH	
	小 种 4	小 种 1,4	小 种 4	小 种 1,4
—	20.9	18.2	4.8	5.1
+	36.5	38.5	7.0	7.0

表5 在氨基酸培养基中晚疫病菌对于钙的需要量

培 养 基		菌 体 干 重 (毫 克)		最 终 pH	
氮 源	CaCl ₂ 浓 度 (%)	小 种 4	小 种 1,4	小 种 4	小 种 1,4
门冬氨酸	0	45.5	50.3	5.1	5.8
”	0.001	75.0	85.9	5.4	5.8
”	0.01	91.7	101.8	—	5.8
”	0.1	118.1	96.4	5.8	6.0
门冬酰胺	0	7.8	55.7	6.0	6.7
”	0.001	26.3	88.5	6.2	6.7
”	0.01	—	116.2	6.0	6.7
”	0.1	122.5	115.4	6.0	6.2

氮源并不加入有机酸的培养中,即便没有钙素,晚疫病菌的生长也几乎可以达到最高生长量的一半,达到最高生长量的钙素最低需要量也较低,约在 CaCl_2 浓度 0.01% 左右(表 5)。

当试验氯化钙、苹果酸和硫酸铵的各种浓度的组合时,发现这三个因素是相互联系的。在硫酸铵和苹果酸供应不足的条件下,提高钙浓度没有良好的效应;在钙素不足的条件下提高苹果酸和硫酸铵的供应对小种 1,4 反而有抑制生长的作用(表 6)。在小种或分离系间显然还存在着对于苹果酸敏感性的差异。

表 6 在晚疫病菌营养中钙素、苹果酸和铵态氮浓度的相互关系

培养基中下列成分含量			菌体干重(毫克)		最 终 pH	
$\text{CaCl}_2(\%)$	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4(\text{M})$	苹果酸(M)	小 种 4	小 种 1,4	小 种 4	小 种 1,4
0.01	0.01	0.02	105.2	25.2	5.8	5.8
0.01	0.005	0.01	79.0	64.4	6.0	6.2
0.1	0.01	0.02	132.1	126.1	5.4	5.6
0.1	0.005	0.01	68.9	68.1	5.4	5.8

马铃薯晚疫病菌象本属所有其他的种一样对于硫酸素是异养的^[11]。酒井^[2]认为最适浓度为 0.1 ppm,而各个作者的用量则从 0.05 到 1.0 ppm 不等。我们的试验结果表示在硫酸铵苹果酸培养液中培养时 0.05 ppm 就基本上满足了生长的需要,较大的量也并没有不良影响(表 7)。

表 7 马铃薯晚疫病菌生长的硫酸素需要量

硫酸素盐酸盐浓度(ppm)	菌 体 干 重 (毫 克)	
	小 种 4	小 种 1,4
0	8.2	16.7
0.05	114.6	124.7
0.1	115.5	130.8
0.2	129.9	133.2
0.4	140.0	147.7
0.8	135.1	132.4
1.6	138.5	145.6

Hodgson^[10] 首先发现抗坏血酸和巯基乙酸钠激发了一些小种在养料较差的基础培养基中的生长,而半胱氨酸和谷胱甘肽便没有这种作用。Henniger^[9] 观察到半胱氨酸、抗坏血酸和巯基乙酸对于胱氨酸的抑制作用都能发生拮抗的效应。在含有适宜浓度的硫酸铵、苹果酸和钙素的培养基中,我们验证了巯基乙酸钠有加速晚疫病菌生长的趋向,但是半胱氨酸不仅没有促进作用而且有显著的抑制作用(表 8)。

为了检验疫霉属其他种与腐霉是否和晚疫病菌一样对钙与苹果酸都是必需的,我们曾用茄疫病菌(*Phytophthora parasitica*),烟草黑胫病菌(*P. parasitica* var. *nicotianae*)和黄瓜绵腐病菌(*Pythium deBaryanum*)进行试验。发现所试三种菌在加入钙的培养基中都显著地增加生长量,且随钙浓度的增加而提高(表 9)。苹果酸的加入提高生长量达 3.5—10 倍(表 10)。由表 10 还可看出苹果酸在稳定 pH 上有很大作用。未加苹果酸的培养基,由于铵根的被利用而使 pH 下降,不利于菌的继续生长。

表 8 巯基乙酸钠与半胱氨酸对于马铃薯晚疫病菌生长的影响

试 验	附 加 物*	菌 体 干 重 (毫 克)	
		小 种 4	小 种 1,4
1	0	158.9	58.7
	半 胱 氨 酸	38.8	1.0
2	0	132.1	126.1
	半 胱 氨 酸	37.3	22.3
3**	0	100.2	37.4
	半 胱 氨 酸	57.4	28.6
	巯 基 乙 酸 钠	108.9	72.2

* 浓度为 0.001 M。

** (NH₄)₂SO₄ 浓度为 0.005 M; 培养时间二星期。表 9 三种疫霉与腐霉在 (NH₄)₂SO₄ 苹果酸培养基中对于钙的需要量

培 养 基 中 CaCl ₂ 含 量 (ppm)	菌 体 干 重 (毫 克)			
	晚疫病菌 1,4 小种 (<i>P. infestans</i>)	茄 疫 病 菌 (<i>P. parasitica</i>)	烟草黑胫病菌 (<i>P. parasitica</i> var. <i>nicotianae</i>)	黄瓜绵腐病菌 (<i>Pythium deBaryanum</i>)
0.1	0.6	37.5	77.1	82.8
1.0	6.7	44.0	90.7	72.7
10.0	13.2	77.0	108.3	93.6
50.0	59.3	96.5	139.3	98.8
100.0	52.2	113.7	126.2	92.0
500.0	100.9	81.3	164.9	112.0
1000.0	116.9	145.1	150.0	119.2
5000.0	120.8	147.1	146.3	132.7
10000.0	77.3	159.4	131.4	115.3

表 10 苹果酸在以 (NH₄)₂SO₄ 为氮源并含有 0.1% CaCl₂ 的培养基中对三种疫霉与腐霉生长的促进作用

苹 果 酸	菌 体 干 重 (毫 克)				最 终 pH			
	马铃薯晚疫病菌	茄疫病菌	烟草黑胫病菌	黄瓜绵腐病菌	马铃薯晚疫病菌	茄疫病菌	烟草黑胫病菌	黄瓜绵腐病菌
-	0	38.8	26.1	14.9	5.4	3.0	4.6	4.6
+	133.9	136.8	145.0	154.3	5.4	5.4	5.4	6.4

讨 论

迄今为止,马铃薯晚疫病菌的营养研究工作者,除 Seidel^[14] 和作者^[3]外,都认为供应氨基酸或更复杂的有机氮源是必要的。这是因为在他们的培养基中没有使用有机酸和钙素^[5,7],没有使用有机酸^[2],有机酸的用量太小^[8],或是没有同时使用有机酸和钙素^[10]。Seidel 则由于钙的用量太小而没有发现最适宜的有机酸。

现在看来,晚疫病菌同化硝态氮的能力确实很差。这是它与同属其他真菌在营养上

的主要差别^[1,13]。但是,铵态氮在适宜和足够的有机酸及钙素供应条件下是完全可以满足它的需要的。

最适宜的有机酸,苹果酸和草酰乙酸,都是属于 Krebs 循环中的。这表示在晚疫病菌的碳代谢途径中 Krebs 循环的某些环节也许本来就很薄弱或者受了铵态氮代谢的阻碍。这些有机酸的作用大概不仅在于缓冲铵态氮代谢所引起的 pH 下降,而且在于较直接地提供能与铵态氮相结合而合成适宜初氨基酸的酮酸。

然而,有机酸由于破坏营养液中的离子平衡又有毒害。陈延熙和林传光^[4]早已在腐霉生理的研究中提出了这一假设。最近 Page 与 Wood^[11]又在晚疫病菌上获得提高盐浓度破坏液体平衡引起菌丝中氨基酸和核酸外渗的直接证据。看来,钙的作用首先就在于防止无机和有机阴离子对于营养液平衡的破坏,象陈延熙等也已经初步观察到的那样。此外,钙素还对某些其他毒物有解毒作用。晚疫病菌在氨基酸培养基中的生长也需要一定数量钙素供应的事实也许说明这一病菌对于离子不平衡或其他毒物特别敏感,或者钙素在它的氮代谢过程中也有特异性的作用。

半胱氨酸的抑菌作用不在于一般的还原性也不在于所含的巯基,因为有还原性含有巯基的巯基乙酸钠对于晚疫病菌似乎是一种辅助生长素。值得对于巯基乙酸钠、半胱氨酸、胱氨酸、抗坏血酸等物质的作用做进一步的比较研究。

总的说来,马铃薯晚疫病菌,作为寄生性水平较高的一种真菌,基本代谢能力水平并不很低。除了碳源上的异养性外,它只失去了同化硝态氮和合成硫胺素的能力。虽然感病的寄主作为病菌营养的基物可能提供较好的碳源、氮源、维生素、辅助生长素以及其他营养环境,寄主-寄生物相互关系的特异性看来主要决定于双方彼此对抗物质的产生。

摘 要

研究中获得证据表明:(1)马铃薯晚疫病菌同化硝态氮能力很弱。(2)在钙素和适宜有机酸供应充足的条件下,铵态氮完全可以满足它的营养需要。(3)苹果酸和草酰乙酸是最适宜的有机酸。(4)钙离子的需要量随培养液中有机酸的加入量而提高。(5)当以氨基酸为氮源时,钙素和苹果酸对生长也是有利的,但需要量较低。(6)菌体最高生长量的最低硫胺素需要量在 0.05 ppm 左右。(7)巯基乙酸钠有加速生长的作用,而半胱氨酸则有抑制作用。(8)钙与苹果酸对同属的其他种与腐霉也是必需的。

参 考 文 献

- [1] 林传光,梁平彦:微生物学报,11:(470),1965。
- [2] 酒井隆太郎:日本植病会报,19:141—145,1955。
- [3] 黄河、徐大雅、林传光:植病学报,6:225—228,1963。
- [4] Chen, Y. H. and Lin, C. K.: *Chinese J. Agric.*, 1:143—152, 1949.
- [5] French, A. M.: *Phytopath.*, 43:513—516, 1953.
- [6] Gaertner, A.: *Archiv Mikrobiol.*, 32:261—269, 1959.
- [7] Hall, Angela M.: *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 42:15—26, 1959.
- [8] Henniger, H.: *Phytopath. Z.*, 34:285—306, 1959.
- [9] Henniger, H.: *Z. Allg. Mikrobiol.*, 3:126—135, 1963.
- [10] Hodgson, W. A.: *Canad. J. Plant Sci.*, 38:145—154, 1958.
- [11] Page, O. T., and Wood, F. A.: *Phytopath.*, 53:946—949, 1963.

- [12] Payette, P. A. et Perrault, C.: *Canad. J. Res.*, **22**:127—132, 1944.
[13] Roncadori, R. W.: *Phytopath.*, **52**:1220, 1962.
[14] Seidel, Helga.: *Phytopath. Z.*, **41**:1—26, 1961.

FURTHER STUDIES ON SYNTHETIC MEDIA FOR *PHYTOPHTHORA INFESTANS*

HWANG HO, HSU TA-YA AND LIN CH'WAN-KWANG

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica Peking*)

Further experiments on the components of synthetic media for *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary give the following results:

- (1) The nitrate assimilating capacity of the fungus is very weak.
- (2) Under conditions of sufficient supply of calcium and a proper organic acid, ammonium salt is a fully adequate source of nitrogen for the fungous nutrition.
- (3) Two Krebs cycle acids, malic acid and oxalacetic acid, have been found to be most favourable for growth among organic acids tested.
- (4) The amount of calcium ion required increases with the amount of organic acid added in the medium.
- (5) A supply of calcium and malic acid also promotes the growth of the fungus when amino acids are employed as nitrogen source, but the requirement is lower in this case.
- (6) The minimum amount of thiamin to support full growth lies at about 0.05 p.p.m.
- (7) In our basal medium, sodium thioglycollate tends to accelerate, whereas cysteine tends to inhibit, the fungous growth.
- (8) Calcium and malic acid are also profitable to other species of *Phytophthora* and *Pythium* when ammonium salt is used as nitrogen source.