

辣椒疫霉菌单个孢子囊快速分离及复壮技术研究

柴贵贤, 巩振辉, 李大伟, 黄 炜, 逯明辉, 陈儒钢

(西北农林科技大学 园艺学院 陕西 杨凌 712100)

摘 要: 通过研究马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)和PDA含药选择性培养基(PDA PR)对辣椒疫霉菌单个孢子囊分离的影响, 筛选出最佳进行单个孢子囊分离的培养基; 利用一对抗、感品种作为寄主, 通过常规抗病性鉴定技术, 对陕西辣椒疫霉菌复壮前后的致病力进行了测定。结果表明: 最佳进行辣椒疫霉菌单个孢子囊分离的培养基是PDA含药选择性培养基, 其分离率高达95%, 其中污染率只有15.8%; 复壮前后菌株对感病品种的致病力有明显的差异, 复壮后菌株的致病力比复壮前提高27.2%, 且与刚分离后菌株的致病力相当, 说明通过复壮能够恢复辣椒疫霉菌菌株的致病力。

关键词: 辣椒疫霉菌; 单个孢子囊; 分离; 复壮; 致病力

中图分类号: S 641.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)12-0160-03

由辣椒疫霉菌(*Phytophthora capsici* L.)引起的辣椒疫病(*Phytophthora blight*)是辣椒的一种毁灭性病害^[1-3]。该病原菌以土壤或雨水传播为主, 侵染快、蔓延迅速, 短期内即可引起病害爆发^[4]。迄今, 在我国各地均有辣椒疫病大面积发生的报道, 并有逐年加重的趋势, 造成了严重的经济损失^[5-7]。化学防治仍然是目前最有效的防治手段^[8], 但是由于化学药剂的防治受多种环境因素的影响, 使其有效性受到限制, 同时也会造成对生态环境的污染。

辣椒抗病育种是防治该病害最有效的途径之一^[9], 人工接种是鉴定品种抗病性的必要手段^[10]。但是辣椒疫霉菌种的存活时间短, 通常采取频繁转管来保存菌种, 会导致菌种的致病性下降^[11], 这就需要不断地复壮菌株, 但是在病原菌分离过程中, 常常会有各种腐生菌混杂其中, 必须对其进行纯化。因此, 课题组研究了不同培养基对辣椒疫霉菌单个孢子囊分离纯化的影响, 并从中选择最佳进行单个孢子囊分离的培养基, 对辣椒

疫霉菌的复壮进行了试验, 成功地提高了辣椒疫霉菌的致病力, 为辣椒疫霉菌致病力的测定及开展辣椒疫病抗病鉴定奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA): 称取200 g去皮后切成片状或丝状的马铃薯, 煮沸30 min, 4层纱布过滤去除残渣, 加17 g琼脂条, 充分融化, 4层纱布过滤去除残渣, 定容至1 000 mL。

PDA含药选择性培养基(PDA PR): 在①培养基中加入氨苄青霉素(Penicillin)50 mg/L, 利福平(Rifampicin)100 mg/L。

用移液枪吸取以上2种培养基分别涂抹在无菌载玻片上, 厚度均匀, 待凝固后备用, 其余培养基分别倒入无菌培养皿制成平板, 待平板内培养基冷却凝固。

1.2 疫霉菌的培养和病原菌孢子囊诱导

将供试辣椒疫霉菌于马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基上28℃黑暗培养5 d后, 将其转移到光下(4 000 lx, 12 h)培养7 d, 以诱导孢子囊产生。

1.3 病原菌孢子诱导

在孢子囊诱导后的培养皿中注入10 mL无菌水, 4℃放置30~60 min, 常温(20℃)放置1 h, 诱导游动孢子释放。用无菌毛笔刷洗, 2层纱布过滤, 获得游动孢子悬浮液。用血球计数板计数。

1.4 单孢子囊分离

1.4.1 涂布孢子稀释液 在诱导产生孢子囊的培养皿中加10 mL无菌水, 用无菌毛笔刷洗, 2层纱布过滤获得孢子囊悬浮液, 用血球计数板计数, 调节浓度至20个/ μ L, 然后用接种环蘸取悬浮液快速涂布到涂有培

第一作者简介: 柴贵贤(1982-), 女, 甘肃民勤人, 在读硕士, 现主要从事蔬菜育种及生物技术研究工作。

通讯作者: 巩振辉(1957-), 男, 陕西礼泉人, 博士, 教授, 博士生导师, 现主要从事蔬菜种质资源与生物技术研究工作。E-mail: gzh168@yahoo.com.cn。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30571262, 30771467); “十一五”国家科技支撑计划资助项目(2006BAD01A7); “13115”科技创新工程重大科技专项资助项目(2008ZDKG-03); 教育部高校博士点基金资助项目(200807120007)。

收稿日期: 2010-03-26

培养基的载玻片上,越薄越好,宁可有的地方涂不上,也不要余多,使孢子囊单个地散落在培养基上,便于镜检和挑取。

1.4.2 挑取单孢子囊 把涂布好孢子囊悬浮液的载玻片先放到 40 倍下直接镜检,当发现培养基平面上有单孢子囊后,移入视野中央,看其四周缝隙里有无孢子囊,如果没有,再放到 60 倍下调节显微镜的焦距,如果能清晰地看到孢子囊,则固定此焦距不动,调节聚光镜固紧螺钉使光线集中到孢子囊上,并使显微镜物镜头下的光斑变得最小,然后用接种刀(使用金属打扁,以便挑取并切取小块培养基)切取显微镜物镜头下的光斑部的培养基,并用接种针挑取并倒置在新的培养基上,每种培养基各做 20 皿,在 27℃恒温下黑暗培养即可获得单孢子囊菌株。

1.4.3 菌落形态鉴定及不同培养基对辣椒疫霉菌单个孢子囊分离效果的比较 培养 5 d 后,观察 PDA 培养基上的菌落形态,鉴定并统计分离纯化率及其污染率。

$$\text{分离率} = \frac{\text{分离样本数}}{\text{获取菌株数}} \times 100, \text{污染率} = \frac{\text{污染菌株数}}{\text{获取菌株数}} \times 100。$$

1.5 病原菌的复壮

1.5.1 供试菌种 疫霉菌分离物 P15 分离于西北农林科技大学园艺学院实验地。

1.5.2 辣椒材料 供试辣椒品种 B27、CM334 由西北农林科技大学园艺学院辣椒课题组提供。其中 B27 为感病品种,CM334 为高抗品种。

1.5.3 回接复壮 取转代 5 次的供试疫霉菌按上述方法培养和诱孢后,在距幼苗根部 3 cm 处,扎一深 3 cm 的孔,将 3 mL 浓度为 1×10^5 个/mL 的孢子悬浮液注入孔内,接种后土壤保湿,温度保持 28℃左右,使幼苗发病,待发病时,将发病的辣椒植株病变组织取下,用灭菌手术刀在病健交界处切取 5 mm 小段,依次用体积比为 70% 的酒精消毒 30 s、在无菌水中浸泡 30 s、在安替福民消毒液中浸泡 2~3 min、用无菌水冲洗 2~3 次,最后用灭菌的吸水纸吸干表面的水分,放置在 PDA 含药平板培养基上,每皿一小段,28℃恒温黑暗条件下培养 5 d 后,选取长势较好的菌落挑取其边缘的菌丝少许进一步纯化、扩繁与诱孢。在显微镜下观察孢子囊的形态,若与接种前的形态一样,可判定该菌为复壮后的辣椒疫霉菌。

1.5.4 复壮前后菌株致病力的比较 辣椒材料用纱布包好,在 55℃的热水中温汤浸种 15~20 min 后,在 25~28℃的恒温培养箱内暗催芽到种子发芽时播种到育苗盘内,每穴 2 粒,基质使用消毒的草碳、沙子和土(体积比 1:1:1)的混合物,播种后正常水肥管理,待苗长到 6 片真叶展平时进行接种,采用灌根接种法,即接种前 1 d 晚上提前浇透水,在距植株茎基部约 3 cm 处用玻璃棒扎

一个深为 3 cm 的孔,然后用注射器将 3 mL 准备好的孢子悬浮液注入孔内,接种孢子浓度为 1×10^5 个/mL。接无菌水作为对照。接种后保湿 24 h,置于室内,保持室温在 25~28℃,适时浇水保持湿润。7 d 后观察发病情况,调查发病级别,计算病情指数^[1]。各试验每处理 10 株幼苗,重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 不同培养基对辣椒疫霉菌单个孢子囊分离纯化的影响

辣椒疫霉菌株经单孢子囊分离后在 27℃下于不同培养基上培养 5 d 后的生长情况见表 1。在选择性培养基平板上涂布游动孢子囊悬浮液,可成功获得大量由单个游动孢子囊萌发形成的菌落,进而获得纯化的辣椒疫霉菌菌株,分离率达 95%,其中污染率只有 15.8%,在 PDA 培养基上涂布游动孢子囊悬浮液,获得由单个游动孢子囊萌发形成的微小菌落较少,分离率只有 50%,而且其污染率达 70%。

表 1 辣椒疫霉菌在不同培养基上的单个孢子囊的分离效果

培养基	分离样本数	获取菌株数	污染菌株数	分离率/%	污染率/%
PDA	20	19	3	95	15.8
PDAPR	20	10	7	50	70

注: PDA: 马铃薯葡萄糖琼脂培养基; PDAPR: PDA 含药选择性培养基

2.2 辣椒疫霉菌复壮前后致病力差异

试验表明,用 2 个辣椒材料对刚分离、转代 5 次、复壮后的菌株致病力分别进行了灌根法接种测定,从接种后 3 d 的病情指数可以看出,复壮前后菌株的致病力存在明显的差异(表 2)。以 2 个品种的病情指数平均值作为标准,菌株致病力强弱顺序为:刚分离的菌株>转代 5 次的菌株>复壮后的菌株。

表 2 辣椒疫霉菌复壮前后的致病力

鉴别寄主	接种后第 7 天的病情指数/%		
	刚分离	转代 5 次	复壮后
B27	72.3S	45.5MR	72.7S
CM334	0.0I	0.0I	0.0I

注: I: 免疫, DI=0; HR: 高抗, $0 < DI \leq 10\%$; R: 抗病, $10\% < DI \leq 30\%$; MR: 中抗, $30\% < DI \leq 50\%$; S: 感病, $DI > 50\%$ 。

3 讨论

试验中加入氨苄青霉素、利福平的马铃薯选择性培养基能够成功地对辣椒疫霉菌进行单孢分离,获得疫霉菌的纯菌株。因此,要获得单游动孢子囊纯菌株,首先要选用合适的选择性培养基。同时本分离方法都是在超净工作台上和显微镜观察下操作进行的,因此污染少,准确率高,而且操作简单、分离速度较快,解决了分离辣椒疫霉菌单游动孢子囊的困难。

目前单孢子分离技术中广泛应用的主要有 2 种方法:琼胶平板稀释纯化法与琼胶平板表面单孢子挑取法。其中,直接挑取法虽然得到的单孢子可靠,但操作

复杂, 难度大, 较为费时费力, 不适合大量样品的分离^[13]。琼胶平板稀释纯化法操作简便快速。初学者也易于上手, 但是由于这种方法实质上是分离菌落, 不能看到和确定一个菌落是从单个孢子繁殖而来, 纯化的可靠性较差^[14]。而且传统的单孢分离技术由于操作复杂, 技术要求高, 限制了其应用^[15]。但是该方法所用仪器简单, 方法容易掌握, 适用范围广, 该单孢子囊分离方法对许多类孢子囊相对较大, 颜色较深的真菌都适合。如蠕形菌、弯孢霉、链格孢等许多半知菌的分生孢子囊, 锈菌的冬孢子囊、夏孢子囊、锈孢子囊, 黑粉菌的厚垣孢子囊, 鞭毛菌的卵孢子囊, 接合菌的接合孢子囊等。

辣椒疫霉菌致病性衰退是由于转代次数过多、培养时间过长、因外界不良影响或管理不当而造成的从量变到质变的退化性变异过程。这种变异会造成菌株致病力的下降, 为了减少这种现象的发生, 最常用的方法就是控制转代次数, 把转代造成的变异降到最低水平, 但是这并不能从根本上解决问题, 故分离复壮是防止菌株致病力衰退的一种有效措施。该试验表明, 辣椒疫霉菌频繁转管 5 次以后其菌株致病力明显下降, 通过复壮可以恢复其致病力。

参考文献

- [1] 张海英, 刘永刚, 吕和平, 等. 河西地区辣椒疫病菌的形态特征及其致病力的初步研究[J]. 西北农业学报, 2008, 17(1): 74-76.
- [2] 王晓敏, 巩振辉, 袁红栋, 等. 辣椒疫霉菌孢子诱导技术研究[J]. 西北农业学报, 2006, 15(2): 59-62.

- [3] Bon-Sung Koo, Haechul Park, Satish Kalme, et al. α - and β -tubulin from *Phytophthora capsici* KACC 40483: molecular cloning, biochemical characterization and antimicrotubule screening [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2009, 82: 513-524.
- [4] 张政兵, 郭海民. 辣椒疫病防治研究进展[J]. 农药与应用, 2006(8): 10-16.
- [5] 鲁占魁, 樊仲庆, 黄刚. 我国辣椒疫病的发生及防治研究[J]. 宁夏农林科技, 1995(2): 22-25.
- [6] 化贤, 刘波微, 李薇. 四川辣椒疫霉菌生物学特性和辣椒抗霉疫病性鉴定方法初探[J]. 云南农业大学学报, 2005, 20(1): 140-144.
- [7] 杨学辉, 肖崇刚, 袁洁. 贵州辣椒疫病病原鉴定及生物学特性研究[J]. 西南农业大学学报(自然科学版), 2004, 2(4): 413-416.
- [8] 何允波, 唐丽萍, 张宝国. 辣椒疫病菌的抗药性和新药剂的筛选研究[J]. 吉林农业科学, 2004, 29(3): 26-29, 36.
- [9] Ardenf S, Akana M. Vegetable Disease and Their Control [M]. John & Sons, 1986: 509-511.
- [10] 张荣, 辛光云, 刘爱媛. 辣椒疫霉菌保存及游动孢子诱导技术研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(20): 8679-8680.
- [11] 戚仁德, 丁建成. 不同培养基对辣椒疫霉致病力的影响[J]. 安徽农业科学, 2001, 29(1): 96-97, 105.
- [12] 李智军, 龙卫平, 郑锦荣, 等. 广东辣椒疫霉菌分离鉴定及其致病力和生理小种分化研究[J]. 华南农业大学学报, 2007, 28(1): 50-54.
- [13] 张昊, 张争, 许景升, 等. 一种简单快速的赤霉病菌单孢分离方法—平板稀释划线分离法[J]. 植物保护, 2008, 34(6): 134-136.
- [14] 方中达. 植病研究方法 [M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1997: 137-140.
- [15] 董娟华, 罗丽, 王彩霞, 等. 一种强寄生病原真菌的分离方法—毛细管打孔单孢分离法[J]. 中国农学通报, 2009, 25(3): 210-212.

Technology Research on the Single-sporangium Isolation and Rejuvenation of *Phytophthora capsici*

CHAI Gu-xian, GONG Zhen-hui, LI Da-wei, HUANG Wei, LU Ming-hui, CHEN Ru-gang
(College of Horticulture, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract: By studying the effect of the potato dextrose agar (PDA) and PDA drug-containing selective culture medium (PDAPR) on the separation of individual zoospore to obtain the most effective culture for the separation of single *Phytophthora capsici* sporangium. We compared the pathogenicity of *Phytophthora capsici* before and after rejuvenation by using conventional techniques with one disease resistant host plant and a susceptible one. The results showed that the best culture for a single sporangium separation was the PDAPR, with a separation rate of 95%, where the pollution rate was only 15.8%. The pathogenicity of *Phytophthora capsici* after rejuvenation to susceptible plant was significant higher than that of before rejuvenation. The virulence of *Phytophthora capsici* after rejuvenation increased was 27.2%, which shows that the strain pathogenicity can be restored back through rejuvenation.

Key words: *Phytophthora capsici*; single sporangium; isolation; rejuvenation; pathogenicity