

葡萄霜霉病菌孢子囊形成及离体萌发的适宜条件研究

李 雯¹, 冉隆贤^{1,2}, 李会平^{1,2}

(1. 河北农业大学 林学院, 河北 保定 071000; 2. 河北省林木种质资源与森林保护重点实验室, 河北 保定 071000)

摘 要:以葡萄品种“巨峰”和“美人指”为试材,对葡萄霜霉病菌孢子囊形成和离体萌发的适宜条件进行了研究。结果表明:20℃黑暗、湿度100%并加入2%乳糖为葡萄霜霉病菌孢子囊形成的最适条件;葡萄霜霉病菌孢子囊悬浮液经4℃低温刺激0.5 h,用2%乳糖置于15℃黑暗条件下培养,孢子囊萌发率最高。

关键词:葡萄霜霉病;孢子囊形成;适宜条件;孢子囊萌发

中图分类号:S 436.631.1⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)22-0108-03

葡萄霜霉病是危害葡萄最严重的病害之一,我国所有葡萄栽培区几乎都有发生。如果防治不及时,将严重影响葡萄果实的产量和品质,成为生产无公害优质葡萄的严重障碍。葡萄霜霉病为葡萄专性寄生卵菌病害,病原为葡萄生轴霜霉菌(*Plasmopara viticola* (Berk. et M. A. Curtis) Berl. et de Toni),属藻菌界、卵菌门、卵菌纲、霜霉目、霜霉科、轴霜霉属^[1]。葡萄染病后发病部位产生白色霜状霉层,即病原的菌孢子囊和孢子囊梗,孢子囊在有水滴的情况下可萌发产生游动孢子,侵染葡萄的幼嫩组织,借雨水飞溅到近地面的葡萄幼嫩组织进行侵染,可见在葡萄霜霉病的传播蔓延中孢子囊是重要的接种体^[2-7]。

目前,对于葡萄霜霉病的防治已有很多研究并取得一定进展^[8-9],但在拮抗菌株的筛选、诱导抗病性和化学药剂的筛选中都需要大量的孢子囊。另外,防治试验研究通常采用叶盘法^[10-12]、盆栽接种或田间试验,这些方法进展较慢,而孢子囊萌发抑制率的测定则更为快速。因此找到促进孢子囊形成和离体萌发的方法不仅可为实验室研究提供病菌材料,也可离体条件下生防菌和化学药剂的筛选提供更加便捷的途径。

近年来,关于霜霉菌孢子囊的萌发有一些研究,国淑梅等^[13]对黄瓜霜霉病斑产孢和孢子囊萌发进行了研究,发现湿度对孢子囊的影响效果最大,孢子囊在15~20℃下产孢量最大;杨庆森等^[14]对苜蓿霜霉病病原研究表明,孢子囊萌发的适宜温度为15~21℃。但对于葡萄霜霉病菌孢子囊的形成及离体萌发尚鲜见系统的研究。

因此,该试验研究了对不同条件下孢子囊萌发及形成的适宜条件,以期获得大量孢子囊提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试葡萄品种为“巨峰”和“美人指”,采集于河北农业大学标本园。

1.2 试验方法

1.2.1 孢子囊悬浮液制备 从“巨峰”葡萄上采集感染葡萄生轴霜霉菌的新鲜病叶,带回实验室后,用清水洗净,叶柄用脱脂棉包扎后置于铺有纱布的培养皿中,于20℃的培养箱中保湿培养2 d,促进孢子囊产生,用毛笔将孢子囊刷至无菌水中,单层镜头纸过滤去杂质,配成浓度为 1.7×10^6 个/mL孢子囊悬浮液备用^[15]。

1.2.2 孢子囊接种方法 将采集的健康葡萄叶片,用清水洗净,室温下晾干,放入铺有纱布的培养皿中,并用湿润的脱脂棉包上叶柄保湿。用100 μL移液枪将孢子囊悬浮液均匀地滴在叶片上,每半片叶子上接20个点,每点接种5 μL。

1.2.3 不同光照对孢子囊形成的影响 将上述接种好的叶片分别放入24 h光照、12 h光照和12 h黑暗、24 h黑暗,温度20℃,湿度为70%的培养箱中,每处理重复3次,待发现孢子囊后,每天记录发病点数。5 d后,计算孢子囊形成率,孢子囊形成率(%)=发病点数/20×100%。

1.2.4 不同温度对孢子囊形成的影响 将上述接种好的叶片分别放入15、20、25℃,24 h黑暗,湿度70%的培养箱中培养,调查统计方法如上。

1.2.5 不同湿度对孢子囊形成的影响 将上述接种好的叶片放入小培养皿中,去掉盖,再分别放入湿度分别为100%、85%、66%的大培养皿中,用封口膜封口后,20℃,24 h黑暗条件下培养,调查统计方法如上。

1.2.6 不同养分条件对孢子囊形成的影响 分别用2%

第一作者简介:李雯(1988-),女,硕士研究生,现主要从事葡萄霜霉病等研究工作。E-mail:306430171@qq.com。

责任作者:李会平(1974-),女,博士,教授,现主要从事植物病害防治等研究工作。E-mail:805737255@qq.com。

基金项目:国家公益性行业科研专项(果树)资助项目(201203035)。

收稿日期:2014-07-16

乳糖、2%蔗糖和2%葡萄糖配制孢子囊悬浮液,采用半叶法,将孢子囊悬浮液喷到“美人指”葡萄健康叶片的右半片叶子上,左半片叶子喷不加入养分的孢子囊悬浮液。放入温度20℃,湿度100%的培养箱中,24 h黑暗条件下培养。每处理3次重复,每天观察记录孢子囊形成情况。

1.2.7 孢子囊离体萌发适宜条件研究 将含2%乳糖和不含乳糖的孢子囊悬浮液分别在4℃冰箱中低温刺激0.5 h后,均匀涂抹在2%水琼脂培养基上,分别放置在光照、光暗交替(黑暗12 h/光照12 h)、黑暗,温度为15℃的培养箱培养^[13-14],以不进行低温刺激的处理为对照。具体处理见表2。培养24 h后取出,用刀片将水琼脂培养基切成1 cm²小块,放到载玻片上,盖上盖玻片,于10×40倍镜下观察,随机选取10个视野进行统计,计算平均值。每处理3次重复。

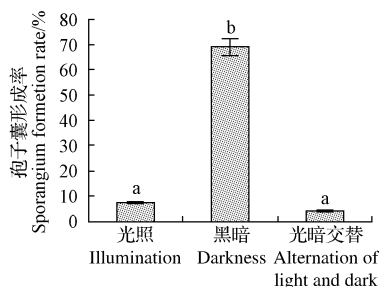
1.3 数据分析

试验数据采用SPSS 11.5软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同光照条件对孢子囊形成率的影响

研究结果表明,将处理好的葡萄叶片放于黑暗条件下培养,其孢子囊形成率最高达68.8%,显著高于其它2种光照条件(图1)。

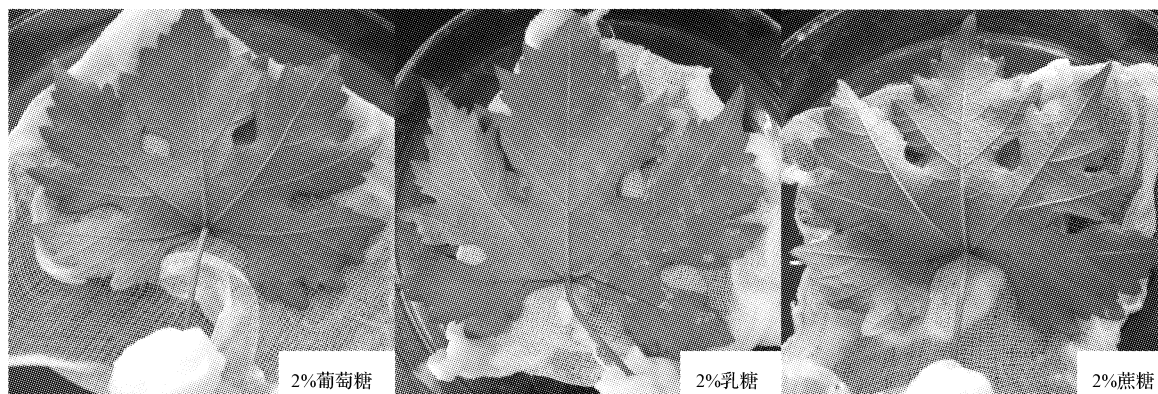


注:不同小写字母表示5%水平显著性差异。

Note: Different lowercase letters show significant difference at 5% level.

图1 不同光照下孢子囊形成率

Fig. 1 Sporangium formation rate under different illumination



注:叶片左半部分喷孢子囊悬浮液,右半部分喷有加了养分的孢子囊悬浮液。

图3 不同养分对孢子囊形成的影响

Fig. 3 Effect of different nutrients on sporangium formation

2.2 不同温度对孢子囊形成率的影响

图2表明,葡萄霜霉菌孢子囊形成率随时间延长逐渐增加,第5天观察15、20、25℃下培养的葡萄叶片孢子囊形成率分别为0、71.7%、11.7%,第7天其形成率分别为5.8%、73.3%、16.7%,其中20℃下孢子囊形成率与15℃、25℃的差异显著,表明20℃下孢子囊形成率最高。

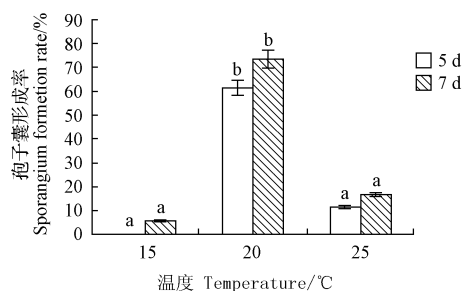


图2 不同温度下孢子囊形成率

Fig. 2 Sporangium formation rate under different temperature

2.3 不同湿度对孢子囊形成率的影响

从表1可以看出,随着湿度的增加,孢子囊形成率逐渐升高。当湿度达到100%时,孢子囊形成率为43.3%,湿度为85%时和66%时的孢子囊形成率分别为1.3%和5.0%。说明环境湿度是影响孢子囊形成的重要因素。

表1 不同湿度下孢子囊形成率

Table 1 Sporangium formation rate under different humidity

湿度 / %	孢子囊形成率 / %	差异显著性
100	43.3	A
85	1.3	B
66	5.0	B

2.4 不同养分对孢子囊形成率的影响

从图3可以看出,2%乳糖处理对葡萄霜霉菌孢子囊的形成具有明显的促进作用,在处理第4天,喷有乳糖孢子囊悬浮液的右半片叶片最先出现孢子囊,在第5天观察时,喷有乳糖孢子囊悬浮液的半片叶片产生

孢子囊的面积明显多于其它养分和对照。

2.5 孢子囊离体萌发条件

从表 2 可以看出,低温刺激、适当养分(2%乳糖)、15℃、黑暗条件促进孢子囊的萌发。一定时间的低温刺激使游动孢子更活跃,适当养分利于孢子囊萌发,温度在 15℃时孢子囊存活状态较好,符合病菌的生物学特性。孢子囊萌发时需要很高的湿度,黑暗条件利于孢子囊充分保湿,促进孢子囊萌发。

表 2 孢子囊离体萌发率

Table 2 Sporangium *in vitro* germination rate %

	无菌水			2%乳糖		
	光照	黑暗	光暗交替	光照	黑暗	光暗交替
常温处理	54.1 AB	69.7 D	67.9 CD	57.0 ABCD	67.3 BCD	63.0 BCD
低温刺激	57.0 ACD	69.3 CD	68.0 CD	44.6 A	85.3 E	66.6 BCD

注:数据含有相同字母的表示差异不显著($P < 0.01$)。

Note: The data in the table contains the same letters show there is no significant difference.

3 讨论

该研究表明,温度 20℃、黑暗、湿度 100%,并加入 2%乳糖最适合葡萄霜霉病菌孢子囊的形成。低温刺激,2%乳糖处理、温度 15℃、黑暗条件下培养最有利于孢子囊的萌发。

葡萄霜霉病菌孢子囊的萌发通常以游动孢子释放、孢子囊排空作为统计标准。但在试验中发现 10×10 倍镜下呈现透明状的孢子囊,在 10×40 倍镜下观察时发现这些孢子囊并未完全透明,孢子囊内仍有游动孢子。因此,认为在进行孢子囊萌发的观察时,采用 10×40 倍镜观察更为准确。

前人对葡萄霜霉病菌孢子囊离体萌发的研究中,大多数采用载玻片萌发法。该研究观察过程中发现,载玻片上的孢子囊和孢囊梗极易大量聚集在一起,给孢子囊萌发的观察造成不便。另外,由于孢子囊的聚集作用,使得载玻片不同部位孢子囊数量和萌发率均有很大差异,影响试验效果。该研究采用的琼脂观察法,对葡萄霜霉病菌孢子囊起到了一定的固定作用,减少了孢子囊聚集的现象,有利于更精确地计算孢子囊萌发率。

孢子囊萌发适宜条件和简便准确的观察方法可为

Optimal Conditions for Sporangium Formation and Germination of *Plasmopara viticola*

LI Wen¹, RAN Long-xian^{1,2}, LI Hui-ping^{1,2}

(1. College of Forestry, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071000; 2. Hebei Key Lab of Forest Germplasm Resources and Protection, Baoding, Hebei 071000)

Abstract: Taking 'Jufeng' and 'Meirenzhi' of grape varieties as materials, the suitable conditions for sporangium formation and germination of *Plasmopara viticola* were investigated. The results showed that the best formation condition for sporangia of grape downy mildew was at 20℃ under dark and 100% humidity, supplemented with 2% lactose, and the optimal conditions for sporangium germination of *P. viticola* was at 15℃ under dark and 100% humidity, supplemented with 2% lactose, followed by stimulation of low temperature at 4℃ for half an hour.

Keywords: grape downy mildew; sporangium formation; optimum condition; sporangium germination

今后生防菌的初步筛选提供更加便捷和可靠的方法,但孢子囊萌发率和发病率之间的关系还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Agrios G N, Beckerman J. Plant Pathology (6th) [M]. Burlington: Elsevier Academic Press, 2011.
- [2] 常永义, 朱建兰. 全球红葡萄霜霉病防治及病菌生物学特性研究[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2001(1): 17-20.
- [3] Williams M G, Magarey P A, Sivasithamparam K. Effect of temperature and light intensity on early infection behaviour of a Western Australian isolate of *Plasmopara viticola*, the downy mildew pathogen of grapevine [J]. Australasian Plant Pathology, 2007, 36: 325-331.
- [4] Perazzolli M, Dagostin S, Ferrari A. Induction of systemic resistance against *Plasmopara viticola* in grapevine by *Trichoderma harzianum* T39 and benzothiadiazole [J]. Biological Control, 2008, 47: 228-234.
- [5] Boubakri H, Chong J. Riboflavin (Vitamin B) induces defence responses and resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine [J]. European Journal of Plant Pathology, 2013, 136(4): 837-855.
- [6] Musetti R, Vecchione A. Inhibition of sporulation and ultrastructural alterations of grapevine downy mildew by the endophytic fungus *Alternaria alternata* [J]. Disease Control and Pest Management, 2006, 96: 689-698.
- [7] Rouzet J, Jacquin D. Development of overwintering oospores of *Plasmopara viticola* and severity of primary foci in relation to climate [J]. EPPO Bulletin, 2003, 33(3): 437-442.
- [8] 付红涛, 何海旗, 张勇, 等. 葡萄霜霉病的发生与防治 [J]. 果树花卉, 2012(5): 54-56.
- [9] 张志强, 王佳武. 葡萄霜霉病防治药剂筛选及防控技术研究 [J]. 农村经济与科技, 2012, 23(6): 182-183.
- [10] 陈娇, 代光辉, 顾振芳, 等. 58 种植物提取液对葡萄霜霉病菌的抑菌活性筛选研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2002, 5(14): 9-13.
- [11] Schwinn F J, Sozzr D. Recommended methods, for the detection and measurement of resistance of pathogens to fungicides; Method for fungicide resistance in blight of potato [J]. FAO Plant Protection Bulletin, 1982, 30: 69-71.
- [12] 李亚娟, 俞立民, 史娟. 葡萄品种对霜霉病的抗性及其叶片分泌物对游动孢子囊萌发的影响 [J]. 农业科学研究, 2008, 29(1): 25-27.
- [13] 国淑梅, 牛贞福. 温湿度对黄瓜霜霉病菌产孢和孢子囊萌发的影响 [J]. 北方园艺, 2012(13): 151-153.
- [14] 杨庆森, 汤春梅, 蔡继. 苜蓿霜霉病病原及其生物学特性研究 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38(1): 207-208.
- [15] 杜兴兰, 李正楠, 姬惜珠, 等. 葡萄生轴霜霉菌孢子囊的长期保存 [J]. 菌物学报, 2008, 27(6): 908-914.