

# 丛枝菌根真菌对辣椒疫霉病害防治的初步研究

张淑彬, 刘建斌, 王幼珊

(北京市农林科学院 植物营养与资源研究所, 北京 100097)

**摘要:**以辣椒品种“国禧 109”为试材,在温室盆栽条件下,研究丛枝菌根真菌 *G. mosseae* 和 *G. intraradices* 2 个菌种的各 5 个菌株对辣椒疫霉病害的防治效应。结果表明:接种丛枝菌根 (Arbuscular mycorrhizal, AM) 真菌的多数菌种能够抑制辣椒疫霉病的发生,对疫霉病的相对防治效果为 37.0%~75.0%。不同菌种或菌株之间的防治效果也有很大的差异, *G. mosseae* 菌种的防治效果要强于 *G. intraradices* 菌种,其中 GM5 菌株防治效果达到了 75.0%, *G. intraradices* 菌种仅有 1 个菌株 GI7 的防治效果达到了 50.0%。 *G. mosseae* 菌种具有防治辣椒疫霉病害的应用潜力。

**关键词:**丛枝菌根真菌;辣椒疫霉;辣椒;侵染率;发病指数

**中图分类号:**S 436.418.1<sup>+</sup>9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)05-0125-04

辣椒疫病是辣椒生产上的一种严重病害,是由辣椒疫霉 (*Phytophthora capsici*) 引起的土传病害。该病害已成为当前辣椒生产中毁灭性病害,也是辣椒产业中亟待解决的主要病害。众多研究已证实,丛枝菌根 (Arbuscular mycorrhizal, AM) 真菌可提高植物的抗病性和耐病性,尤其是能抑制部分病原真菌、细菌及线虫等的危害,预先接种 AM 真菌可提高一些作物对土传病害的抗/耐病性,减轻病害危害<sup>[1]</sup>。在盆栽条件下播种黄瓜同时接种 *Glomus etunicatum*,显著降低了黄瓜枯萎病的发病率和病情指数,研究认为该 AM 真菌菌种对黄瓜枯萎病具有一定的生防价值<sup>[2]</sup>。在大田条件下,接种 AM 真菌能显著降低西瓜枯萎病的发病率、病情指数、根内和根围土壤中镰刀菌繁殖体的数量,促进植株对 N、P、B 和 Zn 等矿物质的吸收,促进植株生长,增加西瓜产量<sup>[3]</sup>。接种 AM 真菌能够提高玉米对小斑病的抗性<sup>[4]</sup>。有研究表明,AM 真菌对高山红景天根腐病<sup>[5]</sup>、桉树幼苗青枯病<sup>[6]</sup>、茄子黄萎病<sup>[7]</sup>、黄瓜立枯病<sup>[8]</sup>、烟苗青枯病<sup>[9]</sup>、玉米纹枯病<sup>[10]</sup>等有明显的防效。AM 真菌对辣椒疫病的防治研究尚鲜见报道,因此该试验旨在盆栽条件下,探索

不同 AM 真菌对辣椒疫病的影响,以期辣椒疫病的生物防治提供理论基础及生防材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验于 2013 年在北京市农林科学院植物营养与资源研究所温室完成。供试辣椒品种为“国禧 109”。供试辣椒疫霉 (*Phytophthora capsici*) 由植物营养与资源研究所实验室分离得到。供试 AM 真菌菌种由北京市农林科学院植物营养与资源研究所“丛枝菌根真菌种质资源库 (Bank of Glomeromycota in China, BGC)”提供,菌种是以高粱为寄主,灭菌的沸砂混合物为基质,分别以相应菌种的孢子富集培养 4 个月获得,菌剂中含有 AM 真菌孢子、菌丝和被侵染的根段。菌种信息如表 1。

在培养疫霉的固体培养基上用灭菌枪头的圆面打成大小相等的小块,将 20 个小块倒接于 10 mL 灭菌土壤水中,28℃ 培养 24 h,用 2 层无菌纱布过滤,用血球计数板计数滤液中的孢子数,用灭菌水调节孢子数至 10<sup>5</sup> 个/mL,备用。供试基质为等体积混合的沸石和河沙,经间歇高温湿热灭菌 2 h 后备用。育苗营养盘为 72 穴苗盘。试验营养钵为大小 8 cm×8 cm×8 cm 的黑色塑料钵,均用 84 消毒液密封浸泡 30 min 后备用。

### 1.2 试验方法

试验首先采用高温灭菌的沸砂基质培育辣椒幼苗,育苗盘每穴接种 AM 真菌菌剂各 5 g,不接种对照处理加入等量的灭菌菌剂和 5 mL 菌种滤液,以保证其它微生物的种类相一致。辣椒出苗后 30 d 定植到装有 500 g 上述灭菌基质的黑色塑料钵中,每钵定植 1 株,缓苗 15 d 后每钵接种辣椒疫霉 2 mL。每钵每隔 7 d 浇 20%

**第一作者简介:**张淑彬(1976-),女,硕士,助理研究员,现主要从事丛枝菌根真菌资源评价与应用等研究工作。E-mail: zbinb@163.com.

**责任作者:**王幼珊(1964-),女,硕士,副研究员,现主要从事丛枝菌根真菌资源收集及评价与应用等研究工作。E-mail: wangyoushan5150@163.com.

**基金项目:**北京市农林科学院科技创新能力建设专项资助项目 (KJ CX20140104)。

**收稿日期:**2014-11-25

表 1

供试菌种信息

Table 1

Information of AM fungal isolates

菌种	丛枝菌根真菌种质资源编号	国家微生物资源平台编号	缩写编号
AM fungal isolates	The number of bank of Glomeromycota in China(BGC)	The number of National Natural Science and Technology Platform	Abbreviation
<i>Glomus mosseae</i>	BGC HEB07B	1511C0001BGCAM0049	GM1
<i>Glomus mosseae</i>	BGC YN05	1511C0001BGCAM0013	GM2
<i>Glomus mosseae</i>	BGC BJ01	1511C0001BGCAM0010	GM3
<i>Glomus mosseae</i>	BGC NM04A	1511C0001BGCAM0003	GM4
<i>Glomus mosseae</i>	BGC HK01	1511C0001BGCAM0064	GM5
<i>Glomus intraradices</i>	BGC BJ09	1511C0001BGCAM0042	GI6
<i>Glomus intraradices</i>	BGC HEB07D	1511C0001BGCAM0056	GI7
<i>Glomus intraradices</i>	BGC USA05	1511C0001BGCAM0009	GI8
<i>Glomus intraradices</i>	BGC JX04B	1511C0001BGCAM0050	GI9
<i>Glomus intraradices</i>	BGC AH01	1511C0001BGCAM0030	GI10

Hoagland 营养液 50 mL,其它按常规管理。试验设不接种 AM 真菌和分别接种 *G. mosseae*、*G. intraradices* 的各 5 个菌株处理,共计 11 个处理,此 11 个处理又分别设接种辣椒疫霉和不接种辣椒疫霉 2 个处理,合计 22 个处理,每处理重复 10 次,随机摆放。

### 1.3 项目测定

在盆栽条件下,大椒在温室生长,期间观察统计病害发生情况,依据大椒苗期疫霉病分级标准随时记录幼苗发病情况。大椒苗期疫霉病分级标准:0 级,无症状;1 级,茎基部浅褐色;2 级,茎基部褐色,下层叶片萎蔫;3 级,茎基部褐色,中层层叶片萎蔫;4 级,茎基部黑色,仅生长点存活;5 级,植株死亡。计算发病率、病情指数及防治效果等,发病率(%)=发病株数/调查总株数×100%;发病指数(%)=Σ(病情级数×该级株数)/(调查株数×最高级数)×100%;防治效果(%)=(对照病情指数—处理病情指数)/对照病情指数×100%;发病率达到 50%以上时收获试验。测植株茎粗、株高、地上部植株在 60~70℃下烘 72 h,称干重。菌根侵染率采用墨水醋酸染色法<sup>[11]</sup>染色,菌根侵染率(%)=(菌根根段数/被检根段总数)×100%。

### 1.4 数据分析

采用 SAS 软件对试验数据进行统计分析,5%水平下 LSD 多重比较检验各处理平均值之间的差异显著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 接种不同 AM 真菌对大椒疫霉病害发生的影响

由表 2 可知,与 CK 处理相比,除了 GM1、GI10 处理外,其它各处理对大椒疫霉病均有不同程度的防治效果,其中 GM5 处理发病率和病情指数相对最低,防治效果达到了 75.0%;GM3、GM4、GI7 处理的发病率和病情指数次之,达到了 50%的防治效果。可见,菌种或菌株之间也显示出不同的防治效果,GM 菌种有 3 个菌株 GM3、GM4、GM5 有较好的防治效果,GI 菌种仅有 1 个

菌株 GI7 的防治达到了 50%。显然菌种 GM 较菌种 GI 具有良好的防治病害的潜力。

表 2 不同 AM 真菌对大椒疫霉病害的影响

Table 2 Effect of AM fungi on disease index of

bell pepper seedling infected with *Phytophthora capsici*

处理	发病率	病情指数	防病效果
Treatment	Disease incidence/%	Disease index/%	Control efficiency/%
CK+	80	80	—
GM1+	80	80	0
GM2+	50	50	37.5
GM3+	40	40	50.0
GM4+	40	40	50.0
GM5+	20	20	75.0
GI6+	50	50	37.5
GI7+	40	40	50.0
GI8+	50	50	37.5
GI9+	50	50	37.5
GI10+	80	80	0

### 2.2 不同 AM 真菌和辣椒疫霉病害对大椒生长的影响

由表 3 可看出,与未接种病原的 CK 相比,接种疫霉病原后大椒苗的株高、茎粗、地上部干重均显著低于未接种病原的 CK 处理,说明接种辣椒疫霉抑制了大椒苗的生长。与未接 AM 真菌但接种疫霉的 CK+处理相比,接种 AM 真菌 GM3、GI9 处理的株高显著低于 CK+处理,其它接种 AM 真菌处理的株高与 CK+处理无显著差异。接种 AM 真菌 GM5、GI6、GI7 处理的茎粗显著高于 CK+处理,且 GM5 处理的茎粗与未接病原的 CK—处理差异不显著,说明 GM5 菌株在一定程度上减小了疫霉病害对大椒生长的危害。接种 AM 真菌各处理的根长均显著高于 2 个对照处理,其中 GM2、GM3、GM5、GI6 的根长显著高于其它菌种,表明此 4 个菌种对疫霉病害更敏感。

### 2.3 接种辣椒疫霉对不同 AM 真菌在大椒根系中侵染的影响

由表 4 可知,接种疫霉后菌根侵染率明显低于接种

疫霉前,说明疫霉对 AM 真菌侵染有抑制作用。接种疫霉前各个菌种处理间菌根侵染率有明显差异,其中 GI9 菌株显著高于其它菌种,GM3、GI7 次之;但接种疫霉后,仅有 GI9 的侵染率最高,其它菌种处理的侵染率与对照均无显著差异。表明菌种 GI9 对辣椒疫霉不敏感。

表 3 接种不同 AM 真菌和辣椒疫霉病害对大椒生长的影响

Table 3 Effect of AM fungi and *Phytophthora capsici* on growth of bell pepper seedling

处理 Treatment	株高 Plant height /cm	茎粗 Stem diameter /mm	地上部干重 Dry weight of shoots /g	根长 Root length /cm
CK+	12.1 bc	2.19 cde	0.29 b	264.8 e
GM1+	12.3 b	2.05 e	0.29 b	462.5 bcd
GM2+	10.9 cd	2.45 bcd	0.30 b	542.9 ab
GM3+	10.5 d	2.46 bcd	0.31 b	604.5 a
GM4+	11.3 bcd	2.54 bc	0.35 b	404.6 d
GM5+	11.6 bcd	2.79 ab	0.35 b	546.3 ab
GI6+	11.5 bcd	2.59 b	0.36 b	531.1 abc
GI7+	11.9 bc	2.58 b	0.31 b	424.5 d
GI8+	11.8 bcd	2.47 bcd	0.34 b	442.4 d
GI9+	10.5 d	2.45 bcd	0.31 b	395.2 d
GI10+	11.6 bcd	2.17 de	0.33 b	442.9 bc
CK-	14.3 a	3.07 a	0.47 a	268.7 e

表 4 接种辣椒疫霉前后不同 AM 真菌对大椒根系的侵染率

Table 4 Infection rate of AM fungi in the bell pepper root before and after vaccination pepper *Phytophthora capsici*

处理 Treatment	接种疫霉前侵染率 Infection rate before/%	接种疫霉后侵染率 Infection rate after/%
CK+	0.0 d	0.0 b
GM1+	1.1 d	0.0 b
GM2+	1.7 d	5.3 b
GM3+	18.6 b	8.7 b
GM4+	7.6 c	0.0 b
GM5+	1.4 d	0.0 b
GI6+	9.5 c	2.0 b
GI7+	13.3 bc	2.7 b
GI8+	0.0 d	0.0 b
GI9+	37.1 a	20.7 a
GI10+	9.0 c	0.0 b

### 3 结论

菌根是土壤中一类有益真菌—丛枝菌根真菌与宿主植物根系建立的互惠共生体,能参与植物多种生理生化代谢过程,对植物有着多方面的作用,尤其是在诱导植物提高抗病性方面起到了非常积极的作用,从而减轻了病原物对植物的危害程度。该试验研究了接种不同 AM 真菌对大椒苗期疫霉病的影响,结果发现接种 AM 真菌的多数菌种能够抑制大椒苗疫霉病的发生,并

且病害的发病率减轻了近 50%,对疫霉病的相对防治效果为 37.0%~75.0%。不同菌种或菌株之间的防治效果也有很大的差异,GM 菌种的防治效果要强于 GI 菌种,其中 GM5 菌株防治效果达到了 75.0%,GI 菌种仅有 1 个菌株 GI7 的防治达到了 50.0%。显然 GM 菌种较菌种 GI 具有潜在的防治病害的能力。

辣椒疫霉从苗期到成株期都能引起严重病害,在苗期,病原菌为害根茎,使组织腐烂,病斑呈水浸状软腐变褐,叶片很快萎蔫,常导致幼苗猝倒枯死,发病快而危害严重。该研究中接种疫霉病原后,从大椒苗株高、茎粗、地上部干重与不接种疫霉的对照相比,辣椒疫霉严重抑制了大椒苗的生长。接种 AM 真菌各处理的地上部干重与未接 AM 真菌 CK+处理相比,无显著差异,只有个别菌种的株高、茎粗高于 CK+处理,表明因为辣椒疫霉发病快危害重,接种 AM 真菌并没有很大程度上减小疫霉病害对大椒生长的危害。仅有 GM5 菌株不仅防治效果达到了 75%,而且其茎粗显著高于 CK+处理,该 GM5 菌株在一定程度上减小了疫霉病害对大椒生长的危害。

AM 真菌对土壤养分和水分具有强大的吸收能力,能够改善作物的营养状况,更重要的是 AM 真菌能选择性抑制根围中的部分病原物,减少死株率、发病率和病情指数,保证全苗,而且有研究表明 AM 真菌与病原菌在侵染过程中存在活力竞争的作用。因此在育苗时接种 AM 真菌,使幼苗菌根化,然后移栽大田对于防治作物病害的具有很好的应用前景。

### 参考文献

- [1] 刘润进,李晓林.丛枝菌根及其应用[M].北京:科学出版社,2000.
- [2] 王倡宪,郝志鹏.丛枝菌根真菌对黄瓜枯萎病的影响[J].菌物学报,2008,27(3):395-404.
- [3] 李敏,刘润进,李晓林.大田条件下丛枝菌根真菌对西瓜生长和枯萎病的影响[J].植物病理学报,2004,34(5):472-473.
- [4] 李宝深,冯固,吕家珑.接种丛枝菌根真菌对玉米小斑病发生的影响[J].植物营养与肥料学报,2011,17(6):1500-1506.
- [5] 李熙英,崔东成,黄世臣. AM 菌对高山红景天植株生长及根腐病的影响[J].延边大学学报,2013,35(2):115-118.
- [6] 弓明钦,陈羽,王凤珍. AM 菌根化的两种桉树苗对青枯病的抗性研究[J].林业科学研究,2004,17(4):441-446.
- [7] 李树林,赵士杰,郑红丽. VA 菌根真菌和覆膜对茄子黄萎病及茄根区微生物量的影响[J].内蒙古农业大学学报,2005,26(1):1-4.
- [8] 贺忠群,李焕秀,汤浩茹.丛枝菌根真菌对黄瓜立枯病的影响[J].四川农业大学学报,2010,28(2):200-204.
- [9] 江龙,王智明,张长华,等.菌根烟草的抗青枯病效应研究[J].中国烟草学报,2009,15(6):49-52.
- [10] 黄京华,曾任森,骆世明. AM 菌根真菌诱导对提高玉米纹枯病抗性的初步研究[J].中国生态农业学报,2006,14(3):167-169.
- [11] Horst V, Andrew P, Coughlan U W, et al. Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(12):5004-5007.

DOI:10.11937/bfyy.201505037

# 番茄细菌性溃疡病菌的定性 PCR 检测方法

毛芙蓉<sup>1</sup>, 李飞武<sup>2</sup>, 刘燕妮<sup>1</sup>, 刘井莉<sup>1</sup>, 潘博<sup>1</sup>

(1. 吉林省蔬菜花卉科学研究所, 吉林 长春 130033; 2. 吉林省农业科学院, 吉林 长春 130033)

**摘要:**以 2 个番茄溃疡病菌株和其它 6 种植物病原菌为试验材料, 以 *micA*、*cytC*、*TomA* 等 3 个特异性基因为检测靶标, 采用检测引物设计与优化、特异性测试、灵敏度测试等方法, 研究建立番茄溃疡病菌的定性 PCR 检测方法。结果表明: 依据这 3 个基因建立的 PCR 检测方法可特异、精准检测番茄溃疡病菌, 其中, 以 *TomA* 基因为检测靶标的方法灵敏度可达到 5 copy/ $\mu$ L 或  $10^3$  cfu/mL, 优于另外 2 种方法, 为番茄溃疡病菌的早期诊断提供了快速、准确的技术手段。

**关键词:**植物病原菌; 番茄溃疡病; PCR; 分子检测

**中图分类号:**S 436.412.1<sup>+</sup>9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)05-0128-04

番茄细菌性溃疡病(Bacterial canker of tomato)是由密执安棒形杆菌密执安亚种(*Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*, 简称 *Cmm*)引起的一种维管束病害, 从番茄苗期到收获期均可发病。主要症状表现为叶缘坏死, 茎叶萎蔫, 茎部条斑后开裂, 维管束变色, 后期植株萎蔫死亡<sup>[1-2]</sup>。病菌通过种子远距离传播, 通过农事操作和雨水灌溉近距离扩散传播<sup>[3]</sup>。

自 1909 年首次在美国密执安州的温室番茄上发现以来, 现已广泛分布于全球 60 多个国家和地区, 在我国北京、黑龙江、吉林、辽宁、内蒙古等地均发生严重, 近年来发病呈上升趋势, 成为番茄生产上的一种毁灭性的病害, 造成的产量损失高达 80% 以上<sup>[4]</sup>。建立一种特异性强、灵敏度高的番茄溃疡病原菌的快速检测方法, 对于有效识别和防控番茄溃疡病菌, 指导农民生产至关重要。

随着现代分子生物学技术的快速发展, 植物病原物的分子诊断手段取得了显著进展。基于分子水平检测 *Cmm* 的技术主要有普通 PCR<sup>[5]</sup>、实时荧光 PCR (Real time PCR)<sup>[6]</sup>、巢式 PCR (Nested-PCR)<sup>[7]</sup>、直接 PCR (Direct-PCR)<sup>[8]</sup>、环介导等温扩增方法 (LAMP)<sup>[9-10]</sup> 等。在已公开报道的 *Cmm* 分子检测方法中, 使用的引物大多是依据 *Cmm* 的核糖体 16S rDNA 序列或核糖体基因转录间隔区序列 (16S-23S rDNA ITS) 进行设计的, 这 2 个序列在植物病原菌中虽然具有较好的种间特异性, 但在亲缘关系非常近的亚种间往往仅有 2~3 个碱基的差异, 对检测方法的反应条件具有非常严格的要求<sup>[11]</sup>。该研究以 *Cmm* 的 3 个功能基因 (*micA*、*cytC*、*tomA*) 为检测

第一作者简介: 毛芙蓉 (1980-), 女, 本科, 助理研究员, 研究方向为蔬菜病虫害综合防治。E-mail: lotusfurmao@gmail.com.  
基金项目: 吉林省重点科技攻关资助项目 (20140204032NY)。  
收稿日期: 2014-11-13

## Study on the Resistance of Arbuscular Mycorrhizal Fungi to *Phytophthora capsici* of Pepper

ZHANG Shu-bin, LIU Jian-bin, WANG You-shan

(Institute of Plant Nutrition and Resource, Beijing Academy of Agriculture and Forest Science, Beijing 100097)

**Abstract:** Taking bell pepper 'Guoxi 109' as test material, a pot experiment was conducted to evaluate the influence of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi on the *Phytophthora capsici* of pepper. There were five strains of *G. mosseae* and *G. intraradice* respectively. Most of AM fungi tested significantly reduced the harm of phytophthora blight of pepper, and relative control effect of phytophthora disease was for 37.0%—75.0%. Control effect was quite different between different AM fungi, and *G. mosseae* was more effective than *G. intraradices*, control effect of GM5 reached 75.0%, control effect of GI7 (one strains of *G. intraradices*) reached 50.0%. *G. mosseae* had the potential for the prevention and control of the *Phytophthora capsici* of pepper.

**Keywords:** arbuscular mycorrhizal (AM) fungi; *Phytophthora capsici*; disease index; colonization