

许亚池,王述彬,刁卫平,等.一种便捷高产的辣椒疫霉菌游动孢子产生方法[J].江苏农业科学,2015,43(10):172-173,258.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.10.053

一种便捷高产的辣椒疫霉菌游动孢子产生方法

许亚池,王述彬,刁卫平,刘金兵,潘宝贵,郭广君,戈伟,刘娜

(江苏省农业科学院蔬菜研究所,江苏南京 210014)

摘要:辣椒疫霉菌游动孢子的形成是辣椒疫病发生的前提,疫霉菌产孢条件的优化对辣椒疫病抗性育种具有重要意义。本试验对 V8 培养基的浓度、黑暗培养时间及无菌水处理等条件进行探索,以期获得辣椒疫霉菌游动孢子产生的最佳条件。结果表明:5% V8 培养基最适合辣椒疫霉菌菌丝生长及产孢,产孢量可达 100 万个/mL,在光照试验中发现 5 d 黑暗处理时菌丝生长浓密且在光照条件下易于产孢。结果还发现,无菌水对产孢量有重要作用,黑暗处理后加入适量无菌水进行光照能够大大提高产孢量,最高产孢量可达 750 万个/mL。本试验简化了辣椒疫霉菌的培养,获得了游动孢子最佳产孢条件,为辣椒抗疫霉菌研究奠定了基础。

关键词:辣椒;疫霉菌;游动孢子;产孢条件

中图分类号:S436.418.1⁺9 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)10-0172-02

辣椒疫病是由辣椒疫霉菌(*Phytophthora capsici*)所引起的世界性病害,可造成幼苗猝倒、茎秆枯死和果实腐烂。辣椒疫霉菌最早由美国学者 Leonian 于 1922 年分离并定名为 *Phytophthora capsici*^[1],属鞭毛菌亚门(Mastigomycotina)卵菌纲(Oomycetes)霜霉目(Peronosporales)疫霉属(*Phytophthora*)真菌^[2]。辣椒疫病于 1918 年在美国首次发生后并迅速传播至整个世界,我国也于 20 世纪 50 年代在江苏发现辣椒疫病的发生^[3]。目前在我国各地均有发生,是我国辣椒生产上的主要病害之一。在辣椒种质资源疫病抗性评价与抗性相关基因表达及克隆等相关研究中,需要预先诱发出大量疫霉菌游动孢子作为接种菌源,而对辣椒疫霉菌产孢条件和游动孢子释放条件的优化是上述研究的前提。鉴于目前辣椒疫霉菌培养及产孢条件研究结论复杂多样,还未有一致的标准和方法,本试验选用混合蔬菜汁配制的改良 V8 培养基,对辣椒疫霉菌菌丝培养和产孢过程中的光照、水分等因素进行研究,探索辣椒疫霉菌最佳产孢条件,旨在简化辣椒疫霉菌培养及游动孢子产生过程,为辣椒疫病抗性育种研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用的辣椒疫霉菌来自江苏省农业科学院资源与环境研究所,金宝汤 V8 100% 混合蔬菜汁饮料购于金宝汤亚洲有限公司。

基本培养基:琼脂粉 10 g + 碳酸钙 1.0 g,加蒸馏水定容至 500 mL,120 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。

收稿日期:2014-09-19

基金项目:国家“863”计划(编号:2012AA100103);江苏省自然科学基金(编号:BK20141380);江苏省农业科技自主创新资金[编号: CX(11)1004]。

作者简介:许亚池(1990—),女,安徽芜湖人,硕士研究生,主要从事辣椒疫病抗性育种研究。E-mail:973612804@qq.com。

通信作者:王述彬,博士,研究员,主要从事辣椒种植资源鉴定和辣椒遗传育种研究。E-mail:wangsbep@163.net。

1.2 方法

1.2.1 V8 培养基配比对菌丝生长及产孢影响 配制 5%、10%、15%、20% 等 4 种浓度的 V8 培养基,编号为 1、2、3、4,以基本培养基作为空白对照组,编号为 0,每组 3 次重复。将供试辣椒疫霉菌切块转接到上述 5 种培养基上,置于 28 °C 暗培养 5 d 后记录菌落直径,再移至 28 °C 全光照条件下培养 5 d,10 倍显微镜下观察孢子囊,记录孢子囊数,然后诱导孢子囊释放游动孢子并计算浓度。

1.2.2 黑暗培养时间对菌丝生长及产孢影响 将辣椒疫霉菌接种于 5% V8 培养基上,28 °C 黑暗培养,设置 3、4、5、6 d 黑暗处理,编号为 3、4、5、6,以全光照作为空白对照,编号为 0,每组 3 次重复。培养后 3 d 开始依照试验设置将黑暗处理的培养皿移到全光照条件下,培养后 6 d 时记录菌落直径,10 d 后在 10 倍显微镜下观察孢子囊,记录孢子囊数,然后诱导游动孢子囊释放游动孢子并计算浓度。

1.2.3 水处理对产孢影响 取 28 °C 黑暗培养 5 d 后的疫霉菌,以全光照不加无菌水为对照组,以全光照加入 10 mL 无菌水为处理组,每组 3 个重复。5 d 后诱导孢子囊释放游动孢子并计算浓度。

1.2.4 菌落直径数据统计 菌落直径(cm) = 3 个培养皿菌落直径之和/3。

1.2.5 疫霉菌孢子囊数据统计 10 倍显微镜下随机选取 10 个视野,观察记录孢子囊数并求出 1 个视野的平均孢子囊数:1 个视野的平均孢子囊数(个) = 10 个视野总孢子囊数/10。

1.2.6 诱导孢子囊释放游动孢子及其浓度计算 在培养皿内加入 10 mL 无菌水,4 °C 冰箱处理 30 min,取出置于室温 30 min,冲洗下白色菌落,吸取等量孢子悬浮液,10 倍显微镜下利用 25 × 16 规格血球计数板统计并计算游动孢子浓度:游动孢子浓度(个/mL) = 5 个中方格内游动孢子数/80 × 400 × 10 000。

2 结果与分析

2.1 V8 培养基配比对菌丝生长及产孢影响

辣椒疫霉菌 5 d 黑暗培养 5 d 光照培养后在显微镜 10 倍

视野下镜检,发现 0 号偶尔有孢子囊出现在视野中,菌丝短而稀疏;1 号 5% V8 试验组菌丝较密,接种块中央附近孢子囊出现较少,边缘孢子囊多,1 个视野中平均有 50 个边缘孢子囊;2 号 10% 试验组、3 号 15% 试验组平均 20、40 个;4 号 20% 试验组的中央、边缘孢子囊个数差异不明显,1 个视野中平均 3 个孢子囊。菌落直径与血球计数板所得游动孢子浓度见图 1。由图 1 可以看出,1 号 5% V8 培养基最有利于辣椒疫霉菌菌丝生长与产孢。

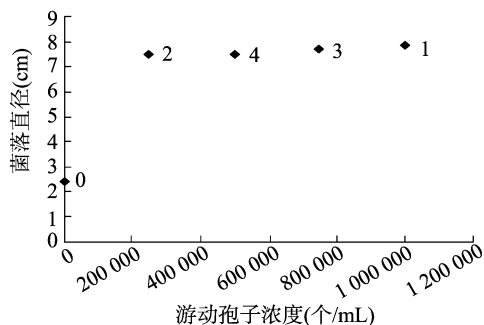


图1 V8 培养基配比对辣椒疫霉菌菌丝生长与产孢的影响

2.2 黑暗处理时间对辣椒疫霉菌菌丝生长及产孢的影响

辣椒疫霉菌经过 0、3、4、5、6 d 黑暗处理后在培养后 10 d 于 10 倍显微镜下镜检,结果发现,0 d 处理菌丝稀少,稀疏地在培养基上生长,1 个视野中平均 2 个孢子囊;3 d 处理菌丝稀疏,1 个视野中平均 4 个孢子囊;4 d 处理菌丝较 3 d 处理浓密,1 个视野中平均 90 个孢子囊;5 d 处理菌丝成棉絮状,但边缘较少,1 个视野中平均 140 个孢子囊;6 d 处理菌丝与 5 d 处理差异不大,但 1 个视野中平均 15 个孢子囊。由图 2 可以看出,在 3 d 黑暗处理中辣椒疫霉菌虽然菌落直径最大,但其菌丝较 5 d 黑暗培养的菌丝不够浓密,并且光照处理后产孢效果没有 5 d 黑暗培养的强,综合选择 5 d 黑暗培养作为最佳黑暗培养时间。

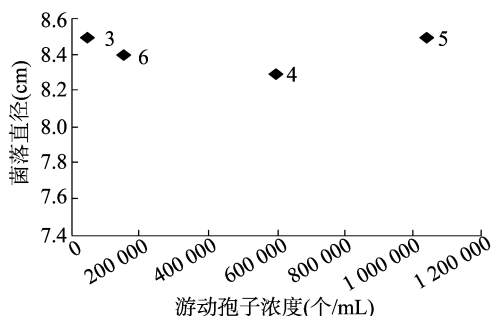


图2 黑暗处理天数对辣椒疫霉菌菌丝生长与产孢的影响

2.3 全光照时加入无菌水对游动孢子释放的影响

辣椒疫霉菌经过 5 d 黑暗培养和 5 d 光照培养后与奥林巴斯显微镜 10 倍视野下观察(图 3、图 4),经血球计数板计数得到加入无菌水的游动孢子浓度高达 750 万个/mL,未加入无菌水的游动孢子浓度为 50 万个/mL。在加入无菌水的试验组中发现,孢子囊一旦成熟就会在水的作用下释放游动孢子,游动孢子聚集在菌丝附近形成游动孢子树的现象(图 5)。

3 结论与讨论

在以往的研究中,对辣椒疫霉菌产孢所适宜的培养基和

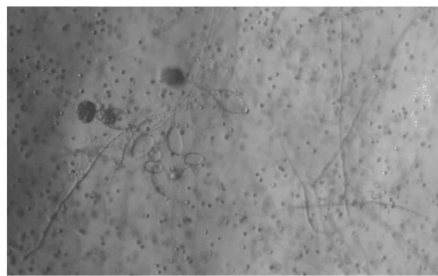


图3 黑暗处理后加无菌水试验组游动孢子释放图示

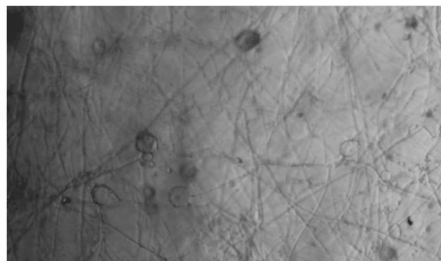


图4 黑暗处理后未加无菌水试验组游动孢子释放图示



图5 游动孢子树

诱导方法存在不同观点。王晓敏等发现,胡萝卜培养基适合辣椒疫霉菌菌丝生长和游动孢子囊产生^[4-6];刘正坪等研究发现,在马铃薯+番茄、PV8 上疫霉菌菌丝生长状况最佳^[7];而徐作珽等认为 V8 培养基营养丰富,能很好地促进辣椒疫霉菌孢子囊的产生,V8 培养基较利马豆培养基、燕麦培养基和胡萝卜培养基、PDA 等具有营养元素稳定、制作简单方便等优点^[8]。本研究在有关 V8 培养基对辣椒疫霉菌培养的报道介绍下,利用 V8 混合蔬菜汁来配制不同浓度的培养基,发现 5% 配比最有利于菌丝生长及产孢。

张政兵等发现,辣椒疫霉菌菌丝生长对光照不敏感,但孢子囊的产生需要光照^[9]。有学者认为在光照培养诱导产孢之前需要黑暗培养,该过程作用是为辣椒疫霉菌产孢积累营养物质,但对于黑暗培养的时间还未见研究。本试验结果发现,光照处理相对黑暗处理有抑制菌丝生长的现象,导致在全光照下培养的菌落直径较小,气生菌丝稀疏;并且发现菌落直径与产孢量并不存在正相关关系,菌落直径大的产孢量不一定大;本试验在辣椒疫霉菌产孢需要光照这一观点上与前人结论一致。在光照培养诱导产孢之前需要黑暗培养,先增加疫霉菌的营养生长,王晓敏推测可能由于营养生长积累了为产生孢子所需的养分,但过分生长是不利于产孢的^[4]。本试验为探索黑暗培养时间进行比较试验,得出 5 d 黑暗处理的

(下转第 258 页)

与 30 周蛋质量极显著正相关(0.551),与 43 周累计产蛋数极显著负相关(−0.295),这与赵振华等的研究结果^[2-3]一致。

2.3.2 体质量与产蛋性能的相关性 开产日龄与初生质量相关性不显著,与开产体质量、18 周体质量、6 周体质量、30 周体质量、初生质量的相关性依次减小,分别为 0.342、−0.285、−0.239、0.127、−0.012;开产蛋质量与开产体质量、30 周龄体质量极显著正相关,与开产体质量、30 周体质量、初生质量、18 周体质量、6 周体质量的相关性依次减小,分别为 0.452、0.314、0.121、0.087、0.048;30 周蛋质量与各阶段体质量极显著正相关,与开产体质量、30 周体质量、18 周体质量、6 周体质量、初生质量的相关性依次减小,分别为 0.288、0.245、0.216、0.192、0.174;43 周累计产蛋数与育成期末极显著负相关,与开产体质量显著负相关,与 18 周体质量、开产体质量、6 周体质量、30 周体质量、初生质量的相关性依次减小,分别为 0.195、−0.142、0.123、−0.078、−0.035,由此可见,育雏育成期体质量和开产体质量对产蛋性能有极其重要的作用。

2.3.3 胫长与产蛋性能的相关性 开产日龄与开产胫长、30 周胫长相关性不显著;开产蛋质量与开产胫长、30 周胫长极显著正相关;30 周蛋质量与开产胫长、30 周胫长极显著正相关;43 周累计产蛋数与开产胫长、30 周胫长相关性不显著。

2.3.4 骨盆宽与产蛋性能的相关性 30 周骨盆宽与开产蛋质量极显著正相关(0.206),与开产日龄、30 周蛋质量显著正相关,与 43 周累计产蛋数相关性不显著(−0.067)。

2.3.5 耻骨间距与产蛋性能的相关性 30 周耻骨间距与开产蛋质量显著正相关(0.141),与开产日龄、30 周蛋质量、43 周累计产蛋数相关性不显著,分别为 0.122、0.054、−0.038。

3 结论

不同开产体质量的坝上鸡开产日龄、开产蛋质量差异显著,随着开产日龄增加,开产体质量增大,开产蛋质量增大。

(上接第 173 页)

效果最好,菌丝生长浓密,光照培养后产孢较多。

辣椒疫霉菌孢子囊在 16~28℃ 下多为间接萌发,即在水中孢子囊萌发释放游动孢子,在 30℃ 以上时多为直接萌发,即在湿度较低时,孢子囊萌发产生芽管^[10]。辣椒疫霉菌侵染寄主的典型过程是通过游动孢子完成侵染的,所以研究水对于游动孢子产生及释放的影响具有重要意义。侯全刚等一致认为,连续光照有利于辣椒疫霉菌产孢^[11-12],但在全光照条件下是否加无菌水培养少有研究,本研究得出水对游动孢子的释放有重要作用,与未加无菌水对照组相比游动孢子浓度高出 1 个数量级。简化游动孢子释放程序是本研究最大的创新,选择 V8 混合蔬菜汁来代替单一培养基,加之研究水对产孢影响得出最简化的产孢条件,增加了游动孢子的释放量,为辣椒疫病研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] Leonian L H. Stem and fruit blight of pepper caused by *Phytophthora capsici* [J]. Nov Phytopathology, 1922, 12: 401–408.
- [2] 许志刚. 普通植物病理学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.

开产胫长越长,开产蛋质量越大,30 周蛋质量和 43 周累计产蛋数也越大。

开产日龄与 43 周累计产蛋数极显著负相关,与开产蛋质量极显著正相关,与 30 周蛋质量相关性不显著,开产蛋质量与 30 周蛋质量极显著正相关,与 43 周累计产蛋数极显著负相关。开产胫长、30 周胫长与蛋质量极显著正相关,与开产日龄、43 周累计产蛋数相关性不显著。

开产体质量与开产日龄、开产蛋质量、30 周蛋质量极显著正相关,与 43 周累计产蛋数显著负相关,育雏育成期末体质量与开产日龄、30 周蛋质量极显著正相关,与 43 周累计产蛋数显著正相关,与开产蛋质量相关性不显著。

30 周骨盆宽与开产蛋质量极显著正相关;与开产日龄、30 周蛋质量显著正相关;与 43 周累计产蛋数相关性不显著。30 周耻骨间距与开产蛋质量显著正相关;与开产日龄、30 周蛋质量、43 周累计产蛋数相关性不显著。

参考文献:

- [1] 杨祥碧,赖守勋,钟茂伦,等. 不同开产体重和均匀度对蛋鸡生产性能的影响 [C]. 中国蛋鸡行业发展大会会刊, 2011: 104–107.
- [2] 赵振华,黄华云,张 静,等. 邵伯鸡母系开产日龄对早期产蛋性状的影响 [C]. 中国家禽科学研究进展——第十四次全国禽科学学术讨论会论文集, 2009: 612–614.
- [3] 刘文峰. 不同开产日龄对 SPF 鸡产蛋性能影响的观察 [J]. 畜牧与兽医, 1999, 31(5): 19.
- [4] 陈志荣. 青年母鸡体重和产蛋性能间的关系 [J]. 山东家禽, 1995(3): 3, 11.
- [5] 伊莎褐. 父母代鸡育成期体重对产蛋期生产性能的影响 [J]. 当代畜牧, 1992(1): 13–14.
- [6] 顾亚玲,龙 翔,杨天平. AA 肉种鸡体重与产蛋量相关性研究 [J]. 内蒙古畜牧科学, 2003, 24(2): 29.
- [7] 张永英,王保安. 海兰灰育成蛋鸡不同体重对生产性能的影响 [J]. 兽药与饲料添加剂, 2001, 6(4): 14.
- [3] 周启明. 辣椒疫霉菌的调查研究 [J]. 中国蔬菜, 1981(1): 40–43.
- [4] 王晓敏,巩振辉,逯红栋,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.
- [5] 兰成忠,刘裴清,李本金,等. 辣椒疫霉菌产孢培养基及诱导方法筛选 [J]. 热带作物学报, 2013, 34(9): 1776–1780.
- [6] 肖爱萍,游春平,李庚花,等. 2 株不同地区辣椒疫霉菌株生物学性状初步研究 [J]. 江西农业大学学报, 2006, 28(3): 368–372.
- [7] 刘正坪,张锦秀,张进文,等. 青椒疫病病原菌生物学特性测定 [J]. 内蒙古农牧学院学报, 1995, 16(3): 32–36.
- [8] 徐作珽,李 林,魏道君,等. 大棚辣椒疫病菌的分离培养及药剂防治 [J]. 植物保护, 1999(2): 30–32.
- [9] 张政兵. 辣椒疫霉菌生物学特性及辣椒疫病的化学防治研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2004.
- [10] 贾菊生. 新疆辣椒疫病及防治研究 [J]. 植物病理学报, 1992, 22(3): 257–262.
- [11] 侯全刚. 不同培养条件对循环化辣椒疫霉菌产孢量的影响 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39(23): 14178–14179, 14182.
- [12] 李立凤,李小梅,张景涛. 辣椒疫霉菌生长和产孢条件的研究 [J]. 东北农业大学学报, 2010, 41(10): 139–142.