

谢业焜,吴娥娇,李冬亮,等. 马铃薯晚疫病菌单孢子囊分离技术的改进[J]. 江苏农业科学,2016,44(4):172-174.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.04.045

# 马铃薯晚疫病菌单孢子囊分离技术的改进

谢业焜, 吴娥娇, 李冬亮, 靳宇佳, 詹家绥

(福建农林大学植物病毒研究所, 福建福州 350002)

**摘要:**针对现行马铃薯晚疫病菌研究中单孢子囊分离方法操作难度大、耗时久、成功率低的问题,在已有的悬浮液分离方法的基础上,利用单个孢子囊含有多个游动孢子,且每个游动孢子遗传物质相同的特点,分离获得单个孢子囊后,采用低温刺激其释放游动孢子,形成了一套分离单个孢子囊的新方法。结果表明,改进后的方法成功率提高了近5倍,操作时间减少了50%,同时操作难度也大大降低,是病原群体研究试验中快速、大批量分离单孢子囊的一种行之有效的办法。该方法成功地应用于马铃薯晚疫病菌(*Phytophthora infestans*)群体遗传和竞争试验研究。

**关键词:**马铃薯晚疫病菌;单孢子囊分离;孢子囊;游动孢子

**中图分类号:** S435.32 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)04-0172-02

马铃薯晚疫病是由致病疫霉(*Phytophthora infestans*)引起的具有很强的破坏力的、给马铃薯生产造成极大危害的病害<sup>[1]</sup>,每年因马铃薯晚疫病造成的直接损失高达数十亿美元<sup>[2]</sup>,因此,明确马铃薯晚疫病的发生、发展和进化规律,对马铃薯晚疫病的管控十分重要。当今研究多集中于病原菌毒力的增减,很少涉及到病原菌的生存策略<sup>[3]</sup>。在自然环境中,由于寄主资源有限,同一寄主可能会被多个病原菌感染,病原菌之间会为了有限的资源展开竞争<sup>[4-5]</sup>。病原菌对寄主多重感染时会采取什么样的繁殖策略,有什么因素会对其造成影响,目前对此众说纷纭<sup>[6-8]</sup>。本研究旨在通过探究不同基因型的病原菌感染同一寄主时,竞争力有何变化,探讨不同病原菌在有限的生存空间中采用何种生存策略。

本研究的技术路线为:(1)选取2个SSR等位基因位点有差异的自育交配型菌株;(2)两两单独、两两混合按1:1的比例接种到马铃薯叶片(感病品种 Favorite)上,每处理重复5次;(3)接菌后第3天开始拍照,至第7天结束;(4)从2个不同菌株混合的处理中分离获得50个孢子囊,分别培养,提取DNA,进行SSR分析;(5)使用ASSESS<sup>[9]</sup>计算病斑大小与发病面积,检验不同等位基因的菌株致病力强弱。

为了得到混合感染后不同菌株竞争力强弱的结果,必须从混合接种的叶片上分离大量的单孢子囊。而传统的单孢子囊分离方法——水琼脂平板划线法<sup>[10]</sup>存在以下不足:(1)水琼脂不含营养物质,孢子囊萌发后无法从水琼脂上获取营养,往往难以长到黑麦培养基上;(2)镜检费时费力,即使操作熟练也需要花3~10 min才能完成1个单孢子囊的分离;(3)水琼脂厚度难以控制,太厚不利于镜检,太薄又易碎,难以转移到黑麦培养基上。由于离体的马铃薯叶片在被马铃薯晚疫病菌感染后极易腐烂,腐烂后的叶片杂菌极多,无法进行单孢子囊分

离,而传统的水琼脂平板划线法效率低下,无法满足试验需要。为此,本试验在袁军海等的研究方法<sup>[11]</sup>基础上进行改进,探寻一种能够快速、高效,适合大批量获取单个孢子囊的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 供试菌株 供试菌株分别于2010年、2011年采自云南省和贵州省安顺市,根据省份和市区首写字母依次编号命名为YN3和AS22。

1.1.2 黑麦培养基 黑麦培养基的制作借鉴Caten等的方法<sup>[12]</sup>:取50 g黑麦于烧杯中,用自来水冲洗干净,加入适量去离子水,室温下浸泡15~20 h,充分研磨后于65℃水浴2 h,用4层纱布过滤去渣,加热煮沸并于滤液中加入12 g琼脂粉,待琼脂粉充分融化后用去离子水定容至1 L,分装,灭菌。

1.1.3 主要器材 三目生物显微镜、血球计数板、恒温培养箱、培养皿(直径9 cm)、玻片等。

### 1.2 方法

1.2.1 水琼脂平板划线法 先倒1层大约1 mm的水琼脂平板,然后将孢子囊悬浮液滴在平板上,于10×10倍显微镜下观察,将含有单个孢子囊的部分小心切下,用镊子将含有孢子囊的一面朝上置于黑麦培养基上,封口,置于18℃恒温培养箱中培养,及时观察其萌发情况。

1.2.2 改进后的分离方法 改进后的分离方法具体操作如下:

(1)用接种针从发病的马铃薯叶片上挑取少许菌丝,在含有200 μL无菌水的2 mL离心管中搅拌数次,待接种针上的菌丝和孢子囊混入无菌水后,用转速为1 500 r/min的涡旋机涡旋30 s,重复2次。随后用血球计数板调整孢子囊悬浮液浓度,将孢子囊悬浮液浓度调整到1个/2 μL。(2)于1片载玻片上放置3个已用75%乙醇灭菌的盖玻片,分别在3个盖玻片上滴1滴孢子囊悬浮液,然后于10×10倍显微镜下镜检,若观测到单个孢子囊,则在液滴上加盖1块0.8 cm×0.8 cm的黑麦培养基,随后将其转移至灭菌过的空培养皿中,封口。(3)将培养皿放至4℃冰箱中低温处理2~3 h,刺激孢子囊释放游动孢子<sup>[13]</sup>,然后转移到11℃的环境存放

收稿日期:2015-11-03

基金项目:国家自然科学基金(编号:31371901)。

作者简介:谢业焜(1990—),男,福建三明人,硕士研究生,从事马铃薯晚疫病菌群体遗传学研究。E-mail:xyk233064545@163.com。

通信作者:詹家绥,教授,从事植物病原菌群体遗传和进化。E-mail:jjasui.zhan@fafu.edu.cn。

16~18 h,促进游动孢子萌发<sup>[14]</sup>,最后放置18℃的恒温培养箱中培养4~10 d。(4)待萌发的孢子囊在黑麦培养基块上产生菌丝,在超净工作台中将其转移至黑麦培养基平板上培养,于18℃恒温培养箱中培养,即可得到由单个孢子囊生长而来的菌株。

## 2 结果与分析

### 2.1 单独侵染与多重侵染病斑面积比较

接种后5 d,YN3菌株单独侵染时相对病斑面积约为12%,AS22菌株单独侵染时相对病斑面积约为7%,而将二者按相同的比例混合,进行多重侵染时,相对病斑面积约为24%,相对病斑面积显著增加了近2倍。

### 2.2 多重侵染单孢子囊分离情况

YN3菌株所占比例为57%,大于AS22菌株所占的43%,这结果符合单独侵染时,YN3菌株的侵染力大于AS22菌株。

### 2.3 单孢子囊分离结果

2种单孢子囊分离结果见表1,对同一菌株采用水琼脂平板划线法分离100个孢子囊,最后仅能存活12个分离物,存活率仅为12%;而采用改进后的方法分离100个孢子囊,最后能存活68个分离物,存活率达到了68%,存活率是改进前的5.7倍。

表1 不同方法分离孢子囊的存活率

方法	分离数(个)	存活数(个)	存活率(%)
水琼脂平板划线法	100	12	12
改进后的分离方法	100	68	68

### 2.4 分离时间比较

从表2可以看出,水琼脂平板划线法熟练操作后,1 h最多仅能分离20个孢子囊。而改进后的方法,1 h能分离出40个孢子囊,时间减少了50%。

表2 不同方法分离孢子囊所消耗时间

方法	分离数(个)	最短耗时(h)
水琼脂平板划线法	100	5.0
改进后的分离方法	100	2.5

## 3 讨论

从试验得到的数据来看,将2个不同基因型的马铃薯晚疫病病菌混合接种到同一叶片上,在接种量(孢子囊数量)保持一致的条件下,混合侵染后的侵染能力明显大于单独侵染。单独侵染时,YN3的相对病斑面积是AS22的1.71倍;混合侵染的叶片上YN3的孢子囊数量是AS22的1.33倍。表明单独侵染和混合侵染时,2个菌株毒力的提高大致呈相同比例,也就是说,混合侵染使得2个菌株互相竞争,为了争取更多的生存空间和资源,二者都提高了自身的毒力,使得自身能在竞争中保持竞争力,避免资源被对方完全占据而失去生存空间。

对于混合侵染时病原物的侵染力有何变化,已有众多学者开展了研究<sup>[6-8]</sup>,前人研究结果表明,由于寄主资源有限,混合侵染会使得病原物之间的竞争加剧,从而使得病原物的侵染力提升<sup>[4-5]</sup>。然而也有一部分试验观察到,混合侵染不仅没有使病原物的侵染力上升,侵染力相比单独侵染时反而下降了<sup>[15]</sup>。本研究结果表明,混合侵染后病原物的侵染力出现显著的提升,且二者的竞争力关系没有发生显著的改变。有些试验的结

论<sup>[15]</sup>却与之相反,甚至在相同病原物、相同寄主的试验中也出现了这种情况<sup>[3]</sup>。今后研究要增加病原物的数量,主要是增加侵染力不同的菌株之间的竞争情况,还有多重侵染时会发生什么情况。将来计划除了本试验中使用的2株马铃薯晚疫病病菌株,再增加2株侵染力相当,但是与本试验所使用菌株有明显差异的马铃薯晚疫病病菌株,按两两组合、3个组合、4个组合进行混合侵染,以便得到更为丰富的试验结果。

当前所使用的单孢子囊分离方法——水琼脂平板划线法明显无法满足如此大量的分离工作。目前,针对马铃薯晚疫病病菌的单孢分离对象主要有2种,一是分离游动孢子;二是分离孢子囊。因为游动孢子体积极小,只有配制成悬浮液方能分离。但是配制成悬浮液后,因为游动孢子体积太小,且不断在悬浮液中游动,镜检后也很难确定其位置,所以分离难度大。孢子囊相对游动孢子大得多,而且在悬浮液液滴中不易移动,容易镜检确定位置,便于分离。

污染率高、萌发率低是影响单孢子囊分离存活率的两大主要问题。杨志辉等采用单游动孢子的方法分离马铃薯晚疫病病菌,平均分离率可高达51.6%<sup>[16]</sup>,如果每个游动孢子都有这样的分离率,一个孢子囊有6个以上的游动孢子<sup>[17]</sup>,完全释放后至少能有3个游动孢子存活。根据上述思路,我们针对单个孢子囊的分离进行改进,用低温刺激的方法促进孢子囊释放游动孢子,进而利用游动孢子的数量来提升存活率。

改进后方法相比较于水琼脂平板划线法,主要改进之处是操作难度降低,工作效率和存活率提高。水琼脂平板划线法首先要镜检,要找到一处只有单个孢子囊的地方,然后还要在显微镜下划线切割,该过程如果操作不当很容易把多余的孢子囊也切割下来。划线切割完成后还要用镊子转移水琼脂块,为了方便镜检,水琼脂平板一般都倒得很薄,所以镊子很容易把水琼脂捏碎,即转移操作难度较大,改进后的方法克服了这一难题。同时,改进后的方法镜检快,只需要检查液滴上是否有单个孢子囊。镜检后操作也很简单,只需要在液滴上加盖1块0.8 cm×0.8 cm的黑麦培养基,再转移到空的培养皿中即可。从实际操作时间来看,改进后的方法大大节省了操作时间,提高了工作效率,为马铃薯晚疫病病菌甚至致病疫霉的群体研究带来了极大便利。

## 参考文献:

- [1] Akino S, Takemoto D, Hosaka K. *Phytophthora infestans*: a review of past and current studies on potato late blight[J]. Journal of General Plant Pathology, 2014, 80(1): 24-37.
- [2] Nowicki M, Foolad M R, Nowakowska M, et al. Potato and tomato late blight caused by *Phytophthora infestans*: an overview of pathology and resistance breeding[J]. Plant Disease, 2012, 96(1): 4-17.
- [3] Clement J A J, Magalon H, Glais I, et al. To be or not to be solitary: *Phytophthora infestans* dilemma for optimizing its reproductive fitness in multiple infections[J]. PLoS One, 2012, 7(6): e37838.
- [4] van Baalen M, Sabelis W. M. The dynamics of multiple infection and the evolution of virulence[J]. American Naturalist, 1995, 146(6): 881-910.
- [5] Brown S P, Hochberg M E, Grenfell B T. Does multiple infection select for raised virulence? [J]. Trends in Microbiology, 2002, 10(9): 401-405.

胡彦江,张茹琴. 光照对花生网斑病菌生长、产孢及致病力的影响[J]. 江苏农业科学,2016,44(4):174-176.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.04.046

# 光照对花生网斑病菌生长、产孢及致病力的影响

胡彦江<sup>1</sup>,张茹琴<sup>2</sup>

(1. 青岛农业大学生命科学院,山东青岛 266109;

2. 青岛农业大学农学与植物保护学院/山东省植物病虫害综合防控重点实验室,山东青岛 266109)

**摘要:**研究了不同光照条件对花生网斑病菌(*Phoma arachidicola* Marasas, Pauer & Boerema)生长、产孢及致病力的影响。结果表明,在燕麦培养基上培养 14 d 时,病原菌在近紫光、全光照条件下的菌落直径(分别为 6.2 cm 和 6.3 cm),显著高于黑暗、光暗交替(12 h-12 h)条件下的菌落直径(分别为 3.9 cm 和 4.3 cm)。在黑暗或光暗交替(12 h-12 h)条件下培养 22 d 时,花生网斑病菌在燕麦、玉米琼脂或花生叶煎汁培养基上均未产生分生孢子,但在近紫光下,除玉米琼脂培养基外,在燕麦培养基和花生叶煎汁培养基上均产生大量的分生孢子,浓度分别为  $3.1 \times 10^6$  个/mL 和  $7.0 \times 10^5$  个/mL。在近紫光下,花生离体叶片于接种病原菌孢子悬浮液后 7 d 开始发病,但在黑暗、光暗交替条件下未发病。因此,近紫光有利于花生网斑病菌菌丝生长、产孢及致病。

**关键词:**花生网斑病菌;光照;生长;产孢;致病力

**中图分类号:** S435.652 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)04-0174-03

花生(*Arachis hypogaea* L.)是一种重要的油料和经济作物,在世界范围内广泛种植。其中,中国是世界上最大的花生生产、消费和出口国。据统计,2013 年我国花生种植面积达  $4.71 \times 10^6$  hm<sup>2</sup>[1]。但由于种植面积的增加,花生连作重茬现象也越来越严重,从而导致各种病害也逐年加重,严重限制了花生产量及品质的进一步提高[2]。随着病害控制过程中农药的大量使用,给花生食品安全及出口也带来了极大的隐患[3]。

花生网斑病,又称云斑病、褐纹病、污斑病,1973 年在美国德克萨斯州首次发生,1982 年首次在我国山东、辽宁等花

生产区发现,随后在陕西、河南等省发生[4]。该病害是一种主要危害花生叶部的真菌病害,也是近年来花生上的严重病害之一[2,4]。在花生中后期发病最重,主要危害叶片,其次危害叶柄和茎部,导致花生生长后期大量落叶,影响产量,一般可减产 10%~20%,严重时达 30% 以上[2,4]。目前,国内外学者就该病害的病原学[5-7]、发生条件[8-9]及田间病害流行动态[4]等方面进行了研究。Marasas 等用发生学方法,结合产孢方式,将该病原菌的无性阶段鉴定为半知菌亚门、球壳孢目、茎点霉属、花生茎点霉(*Phoma arachidicola* Marasas, Pauer & Boerema)[5],我国李君彦等的鉴定结果[7]与之一致。该病菌一般以菌丝和分生孢子器在残叶组织中越冬,病害田间始发期为 6 月上旬,高峰期在 7 月份以后,期间持续阴雨和生长期低温有利于病害发展[7]。病害的发生与花生生育日数、气温和相对湿度呈正相关,与降雨量呈负相关,其中效应最大的为花生生育日数。因此即使不同年度间温湿度有所变化,第

收稿日期:2015-02-09

基金项目:山东省“泰山学者”建设工程专项经费资助项目;青岛农业大学高层次人才启动基金(编号:630901)。

作者简介:胡彦江(1972—),男,甘肃临洮人,实验师,主要从事植物病理学研究。

通信作者:张茹琴,博士,副教授。E-mail:zhruc-72@163.com。

[6] Frank S A. Models of parasite virulence [J]. Quarterly Review of Biology, 1996, 71(1): 37-78.

[7] Davies C M, Fairbrother E, Webster J P. Mixed strain schistosome infections of snails and the evolution of parasite virulence [J]. Parasitology, 2002, 124(1): 31-38.

[8] Staves P A, Knell R J. Virulence and competitiveness: testing the relationship during inter- and intraspecific mixed infections [J]. Evolution, 2010, 64(9): 2643-2652.

[9] 冷伟锋,杨雪,刘琦,等. 基于 ASSESS 图像处理软件的植物病害评估[J]. 中国植保导刊, 2014, 34(2): 10-12.

[10] 张书建,何月秋. 介绍一种简单的真菌单孢子分离法[J]. 云南农业大学学报, 2003, 18(3): 315-316.

[11] 袁军海,姚裕琪. 马铃薯晚疫病病菌单孢分离技术的改进[J]. 植物保护, 2002, 28(2): 58-58.

[12] Caten E C, Jinks J L. Spontaneous variability of single isolates of *Phytophthora infestans*. I. Cultural variation [J]. Canadian

Journal of Botany, 1968, 46(4): 329-348.

[13] Latijnhouwers M, Munnik T, Govers F. Phospholipase D in *Phytophthora infestans* and its role in zoospore encystment [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2002, 15(9): 939-946.

[14] Grenville-Briggs L J, Anderson V L, Fugelstad J, et al. Cellulose synthesis in *Phytophthora infestans* is required for normal appressorium formation and successful infection of potato [J]. Plant Cell, 2008, 20(3): 720-738.

[15] Ben-Ami F, Mouton L, Ebert D. The effects of multiple infections on the expression and evolution of virulence in a Daphnia-endoparasite system [J]. Evolution, 2008, 62(7): 1700-1711.

[16] 杨志辉,朱杰华,郭强,等. 马铃薯晚疫病病菌单孢分离物生物学特性的初步研究[J]. 菌物系统, 2003, 22(1): 148-152.

[17] Bohl W H, Hamm P B, Nolte P, et al. Managing late blight on irrigated potatoes in the Pacific Northwest [M]. University of Idaho Cooperative Extension System, 2003.