

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

李智军^{1,2}, 龙卫平¹, 郑锦荣¹, 雷建军²

(1 广东省农业科学院 良种苗木中心, 广东 广州 510640; 2 华南农业大学 园艺学院, 广东 广州 510642)

摘要:分离鉴定了来源于广东省不同辣椒产区的5个病原菌分离物,经形态特征鉴定及回接发病特征观察,确定这些菌株均为辣椒疫霉菌 *Phytophthora capsici* Leonian. 广东5个菌株在CA培养基上诱导产生的孢子囊形态类似,孢子囊形状多为卵圆形或长椭圆形,乳突明显,孢子囊平均大小 $40.8 \sim 45.9 \mu\text{m}(l) \times 23.2 \sim 30.9 \mu\text{m}(b)$, l/b 1.4~1.8. 菌株间菌丝生长速率、产孢能力及致病力有明显差异,经生理小种鉴别,4个为Race 3,1个为Race 1,初步推定Race 3为广东辣椒疫病病原菌的优势小种.

关键词:辣椒疫病; 辣椒疫霉菌; 致病力; 生理小种

中图分类号:S436.418.19

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2007)01-0050-05

Isolation and Identification of *Phytophthora capsici* in Guangdong Province and Measurement of Their Pathogenicity and Physiological Race Differentiation

LI Zhi-jun^{1,2}, LONG Wei-ping¹, ZHENG Jin-rong¹, LEI Jian-jun²

(1 Seed and Seedling Centre, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China;

2 College of Horticulture, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: Five isolates collected from different pepper-cultivating regions in Guangdong Province were determined. Based on their morphological characteristics and symptoms after re-inoculated to pepper, these isolates were identified as *Phytophthora capsici* Leonian. The sporangia induced on CA medium were morphologically similar and most of their shape were ovate or elliptic, with obvious papillate. The mean size of the sporangium was $40.8 \sim 45.9 \mu\text{m}(l) \times 23.2 \sim 30.9 \mu\text{m}(b)$, with l/b ratio 1.4~1.8. There were evident differences in mycelial growth rate, productivity of sporangia and pathogenicity to pepper among the isolates. Physiological characters test showed that one isolate belonged to Race 1, 4 isolates belonged to Race 3. Race 3 is probably the superior race in Guangdong Province.

Key words: pepper phytophthora blight; *Phytophthora capsici*; pathogenicity; physiological race

辣椒疫病是危害辣椒生产的世界性病害之一,该病病原 *Phytophthora capsici* Leonian 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.迄今,在我国各地均有辣椒疫病大面积发生的报道,并有逐年加重趋势,造成了严重的经济损失^[1-3].近10年来,辣椒作为广东省最为重要的北运蔬菜发展迅速,种植面积已超过16万 hm^2 .随着辣椒

种植面积的扩大及连作加剧,加之生产上缺乏抗病辣椒品种,而化学防治效果甚微,致使该病在高温高湿的广东地区危害尤为严重,因其所造成的损失轻者达20%~30%,重者则超过80%.关于广东辣椒疫病的病原菌特性及其致病性研究,王得元等^[4]对来源于广州市的3个辣椒疫病病原菌分离物进行了鉴定,表明菌株间致病力差异明显.为了进一步探

收稿日期:2006-09-27

作者简介:李智军(1965—),男,副研究员,博士, E-mail: lizhijun04@yahoo.com.cn

基金项目:广东省科技计划项目(2004A20103001);广州市科技攻关重点项目(2005Z2-E0071)

明广东省辣椒疫病病原菌特性和为今后顺利开展辣椒疫病抗病育种奠定基础,本研究就广东不同地区引起辣椒疫病的病原菌进行分离鉴定,并测定其致病力以及生理小种分化。

1 材料与方法

1.1 病原菌的分离

病原菌分离参照郑小波^[5]的方法,从辣椒发病田块采集具有辣椒疫病典型症状的病果或病茎,用自来水连续冲洗 12 h 以上,然后切取病健交接部位 2~3 小块,置于含药胡萝卜培养基(CA)平板(青霉素 50 mg、五氯硝基苯 50 mg、多菌灵 5 mg、利福平 100 mg、胡萝卜 200 g 榨汁、琼脂 20 g/L)上,25~28 ℃ 培养 2 d 后,挑取菌落边缘菌丝少许,转接至不含任何药剂的 CA 培养基上在同样温度条件下培养 3 d。之后,切取分离病原物菌块回接辣椒植株茎部,选取表现出与田间症状相同的分离病原物供鉴定之用。本研究选用的病原菌分离物的采集地点及侵染组织等见表 1。

表 1 病原菌的采集地点、寄主及侵染组织

Tab. 1 Origin, host and infected tissue of isolates

菌株 isolate	编号 epithet	采集地 origin	寄主/品种 host/variety	侵染组织 infected tissue	分离日期 date of isolation
Pc. 1	ZLT0566	广州市钟落潭镇	辣椒/广椒 2 号	病茎	2005-05-06
Pc. 2	HZ05628	惠州市惠城区	辣椒/东方神剑	病果	2005-06-28
Pc. 3	ZH0575	珠海斗门	辣椒/华叶 39 号	病果	2005-07-05
Pc. 4	LZ0579	连州白云庄镇	辣椒/茂椒 4 号	病果	2005-07-09
Pc. 5	YD05720	英德西湖塘村	辣椒/不详	病果	2005-07-20

1.2 病原菌鉴定

纯化菌株在 CA 培养基上 25~28 ℃ 培养 3 d 后,切取菌落边缘 $d=4$ mm 的菌丝块移至 CA 平板中央,于黑暗 28 ℃ 恒温下培养 3~5 d,然后观察病原菌的菌落和菌丝形态特征。孢子囊诱导是将在 CA 培养基上生长的纯化菌株置于连续光照下培养 5~7 d,即有大量孢子囊形成,挑取产生孢子囊的菌丝块放入试管中,加水 1 mL,用手拍击数次振脱孢子囊,然后在显微镜下观察孢子囊形态,并测定其大小、柄长和乳突高度。

1.3 菌丝生长速率与产孢能力测定

将分离纯化菌株分别接种于 OMA(燕麦片 60.0 g、琼脂 12.5 g/L)、TA(番茄汁 200 mL、CaCO₃ 4 g、琼脂 20 g/L)、PSA(马铃薯 200 g、蔗糖 20 g、琼脂 20 g/L)及 CA 上,每种培养基接种 3 皿($d=9$ cm),置于 25 ℃

下黑暗培养 3 d,然后测量每皿菌落 4 个不同方向的半径。之后,将培养皿移至 25 ℃ 恒温培养箱内继续光照培养 7 d,以诱导孢子囊形成。然后在显微镜(10×10 倍镜)下每皿任意选取 4 个视野测定孢子囊数量。

1.4 致病力测定

1.4.1 供试品种与育苗 选用 8 个辣(甜)椒材料,即“Perennial”、“97031”、“广椒 2 号”、“高峰羊角”、“绿早生”、“茂椒 7 号”、“198-1-2”(甜椒)和“茄门”(甜椒)供待测菌株致病力测定。采用塑料育苗盘($h \times d=7$ cm×3 cm,100 穴)育苗,基质使用消毒草炭土和蛭石(体积比 3:1)的混合物。种子播种前在 25~28 ℃ 下催芽 4~5 d,于 2005 年 8 月 6 日和 15 日分 2 期播种,每穴播种 1~2 粒出芽种子,幼苗生长至两子叶一心时进行间苗,使每穴保留 1 株。当苗龄 6~7 叶期(30~35 d)时接种。

1.4.2 灌根接种与发病调查 按 1.2 方法在 CA 培养基($d=9$ cm 培养皿)上诱导孢子囊,加入灭菌水 20 mL,放入 4 ℃ 冰箱中预冷 1 h,之后移至室温促使游动孢子释放,用血球计数板计算游动孢子的数量,调节至游动孢子 2×10^4 mL⁻¹ 作为接种液。接种前,将育苗盘充分浇透水,用注射器于离幼苗根茎约 1~2 cm 处小心注入 3 mL 的游动孢子悬浮液,保湿 12 h 以上。每个品种接种 30~33 株,以感病品种同样注入 3 mL 清水作对照,每日适时浇水保持基质湿润,试验期间大棚内平均最低和最高气温为 25.1 和 37.0 ℃。接种后第 3 d 按文献[6]的分级标准调查发病级别,并计算病情指数。

1.5 生理小种分化鉴定

1.5.1 鉴别寄主 鉴别寄主由亚洲蔬菜研究与发展中心的王添成博士提供,4 个鉴别材料为“Early calwonder”、“CNPH703”、“PBC602”、“PI201234”,其中“Early calwonder”不带有抗病基因,后三者分别含有不同的抗病基因(表 2),其组合可供鉴别生理小种 Race 1、Race 2 及 Race 3。

表 2 辣椒疫霉菌生理小种的判定¹⁾

Tab. 2 Physiological race characterization of *Phytophthora capsici*

鉴别寄主 differential host	生理小种 physiological race		
	Race 1	Race 2	Race 3
Early calwonder	S	S	S
CNPH703	R	S	S
PBC602	R	R	S
PI201234	R	R	R

1) S:感病型;R:抗病型

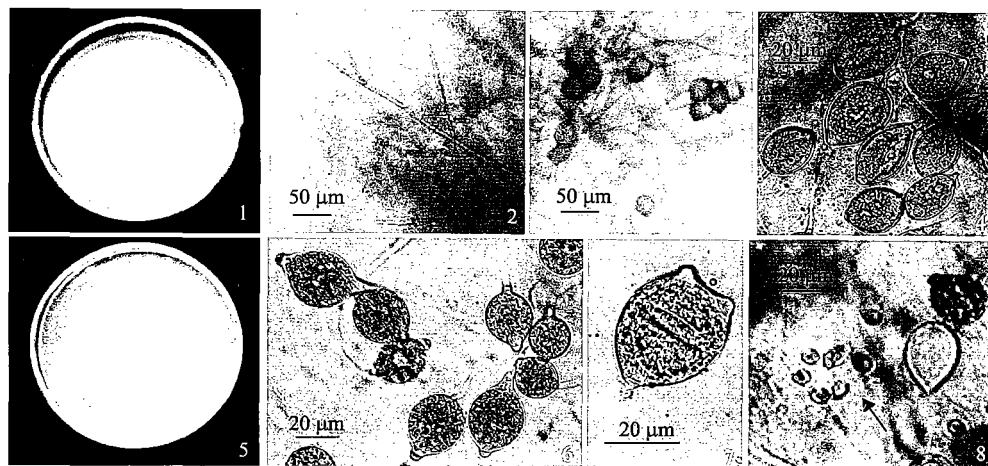
1.5.2 生理小种判定 鉴别寄主育苗、待测菌株孢子囊诱导及接种方法与1.4中叙述的方法相同,接种游动孢子为 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$,当鉴别寄主幼苗6~7叶时进行接种,每一待测菌株接种一套鉴别寄主,每一鉴别寄主30~33株,接种后每周调查1次茎基部发病情况,以第21 d调查的发病结果确定待测菌株的生理小种类型。鉴别寄主的感抗类型划分如下:发病率 $>20\%$ 者为感病型,发病率 $\leq 20\%$ 的为抗病型。

2 结果与分析

2.1 形态特征

从广东5个地区分离纯化的病原菌菌株在CA

培养基上培养3 d后,菌落呈白色,除Pc.3菌株的菌落为浓密绒毛状外,其他4个稀疏,呈花瓣状,生长菌丝均为不规则分枝,无隔,透明(图1)。5个菌株的孢子囊形态类似,多卵圆形或长椭圆形,淡褐色,乳突明显,绝大多数为单乳突,偶有双乳突出现。未观察到厚垣孢子,成双配对培养不产生卵孢子,表明为同一交配类型。5个菌株的孢子囊大小、柄长和乳突因发育程度不同有明显差异,但平均值菌株间差异不大,孢子囊的平均长 $40.8 \sim 45.9 \mu\text{m}$,宽 $23.2 \sim 30.9 \mu\text{m}$,长宽比 $1.4 \sim 1.8$,孢子囊柄长 $32.4 \sim 35.6 \mu\text{m}$,乳突高 $5.1 \sim 5.9 \mu\text{m}$ (表3)。根据分离纯化病原物菌丝的形态、孢子囊形态特征、大小及回接发病症状等断定其为辣椒疫霉菌 *Phytophthora capsici* Leonian。



1:Pc.1 菌落;2:Pc.1 菌丝;3,4:Pc.1 孢子囊;5:Pc.3 菌落;6:Pc.3 孢子囊;7:Pc.1 双乳突;8:Pc.3 游动孢子释放
1:Pc.1 colony;2:Pc.1 mycelium;3,4:Pc.1 sporangia;5:Pc.3 colony;6:Pc.3 sporangia;7:Pc.1 double papilla;8:Pc.3 released zoospore

图1 菌株 Pc.1 和 Pc.3 的菌落及孢子囊形态

Fig.1 Morphology of colony and sporangia of Pc.1 and Pc.3 isolates

表3 分离菌株的孢子囊形态特征¹⁾

Tab.3 The morphological characteristic of sporangia of isolates

菌株 isolate	孢子囊 sporangium			乳突高 height of papilla/ μm	柄长 length of sporangiophore/ μm
	$l/\mu\text{m}$	$b/\mu\text{m}$	l/b		
Pc.1	25.5~60.5(45.9) ²⁾	20.5~40.8(30.9)	0.7~2.7(1.5)	4.0~8.6(5.9)	18.2~55.8(35.6)
Pc.2	20.8~60.4(43.3)	19.4~66.2(28.1)	1.0~2.2(1.6)	3.2~7.2(5.3)	20.0~58.2(35.2)
Pc.3	30.2~60.2(44.4)	20.0~38.2(27.7)	1.1~2.5(1.6)	3.5~8.0(5.4)	15.8~65.2(35.1)
Pc.4	21.6~58.2(40.8)	20.4~36.2(28.2)	1.0~2.4(1.4)	3.2~7.3(5.4)	15.2~58.1(32.4)
Pc.5	31.6~66.4(42.4)	17.5~27.8(23.2)	1.5~2.4(1.8)	3.2~9.2(5.1)	16.5~65.2(35.3)

1)CA 上诱导的孢子囊;2)括号内为平均值

2.2 菌丝生长速率比较

5个辣椒疫病菌株在 25°C 下于不同培养基上的生长速率见表4,各菌株在不同培养基上的生长速率明显不同,5个菌株菌丝均以在OMA上的生长为最快,但菌丝非常稀疏,其次是CA和PSA,可形成洁白

丰满而边界清晰的圆形菌落,在TA上则生长最慢,且菌落呈不太规则形。菌株之间差异在4个培养基上几乎相同,从平均生长速率看,Pc.1、Pc.4及Pc.5菌株明显比Pc.2和Pc.3生长快,三者之间差异不大,Pc.2菌株的生长速率次之,Pc.3菌株生长最慢。

表 4 广东辣椒疫霉菌菌株在不同培养基上的生长速率¹⁾
Tab. 4 The growth rate on different media of *Phytophthora capsici* isolates from Guangdong

菌株 isolate	直线生长速率 growth rate at linear direction/(mm·d ⁻¹)				平均 mean
	OMA	TA	PSA	CA	
Pc. 1	15.6A	9.3A	10.7A	10.9A	11.6
Pc. 2	15.0B	7.4BC	9.6BC	10.6A	10.6
Pc. 3	11.7C	5.7C	9.0C	8.8B	8.8
Pc. 4	15.5AB	9.5A	10.7A	10.9A	11.6
Pc. 5	15.1AB	8.9AB	10.3AB	10.4A	11.2
平均 mean	14.6	8.1	10.0	10.3	

1) 同列中不同字母表示达极显著差异 ($P < 0.01$, Duncan's 法, $n = 4$)

2.3 产孢能力比较

在 25℃ 下测定了各菌株在 4 种培养基上诱导产生孢子囊的能力,从图 2 可以看出,各菌株产孢能力因不同培养基有明显差异. 菌株 Pc. 1、Pc. 4 和 Pc. 5 均以在 CA 上诱导产生的孢子囊数为最多,在 OMA 和 TA 上次之,在 PSA 上诱导产生的孢子囊数最少;Pc. 2 和 Pc. 3 菌株则以在 CA、OMA 及 TA 上诱导产生的孢子囊数较多,三者之间无明显差异,在

PSA 上同样产孢最少. 就菌株间的产孢能力而言, Pc. 1、Pc. 4 和 Pc. 5 菌株产孢能力较强, Pc. 2 次之, Pc. 3 最差.

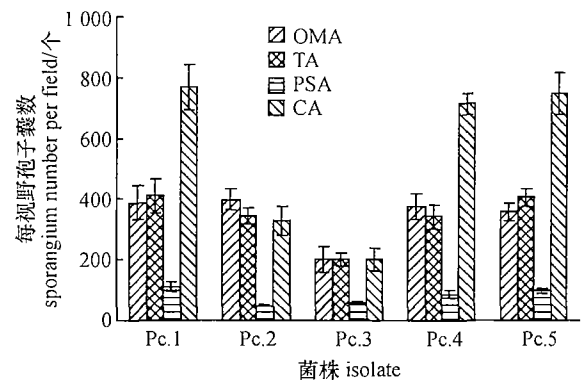


图 2 广东辣椒疫霉菌 5 个菌株在不同培养基上的产孢能力
Fig. 2 The ability of sporangia production on different media of 5 *Phytophthora capsici* isolates from Guangdong

2.4 致病力差异

用 8 个辣(甜)椒材料对来源于广东不同地区的 5 个菌株的致病力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,不同菌株的致病力存在明显的差异(表 5). 以 8 个品种的病情

表 5 广东不同地区辣椒疫霉菌菌株的致病力¹⁾
Tab. 5 The pathogenicity of *Phytophthora capsici* isolates from Guangdong

菌株 isolate	分离地区 location	接种后第 3 d 病情指数 index of disease 3 days after inoculation								平均 mean
		Perennial	广椒 2 号 Guangjiao No2	高峰羊角 Gaofengyangjiao	绿早生 Lüzaosheng	97031	茂椒 7 号 Maojiao No7	198-1-2	茄门 Qiemen	
Pc. 1	广州	3.0HR	33.9MR	50.3S	55.8S	62.4S	58.2S	61.2S	60.6S	48.2
Pc. 2	惠州	2.4HR	14.5R	25.5R	57.0S	57.0S	50.3S	34.5MR	51.5S	36.6
Pc. 3	珠海	0.0 I	6.1HR	2.0HR	18.2R	15.8R	17.6R	27.9MR	40.0MR	16.0
Pc. 4	连州	0.0 I	4.8HR	33.3MR	35.2MR	55.2S	49.1MR	61.3S	68.5S	38.4
Pc. 5	英德	1.3HR	29.7R	41.2MR	48.5MR	56.4S	52.7S	57.3S	56.0S	42.9

1) 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, $DI > 50$

指数平均值作为标准,菌株致病力强弱顺序为 Pc. 1 > Pc. 5 > Pc. 4 > Pc. 2 > Pc. 3,即分离自广州白云区的菌株致病力最强,是致病力最弱的珠海菌株的 3 倍,其次是英德菌株和连州菌株,惠州菌株致病力则相对较弱.

2.5 生理小种鉴别

按照亚洲蔬菜研究与发展中心王添成博士提供的寄主鉴别方法对广东 5 个辣椒疫霉菌菌株进行了生理小种鉴定,其结果见表 6, Pc. 1、Pc. 2、Pc. 4 和 Pc. 5 菌株属 Race 3,而 Pc. 3 属 Race 1,未鉴定到 Race 2, Race 3 占测定菌株数的 80%.

表 6 广东不同地区辣椒疫病菌株的生理小种鉴别¹⁾
Tab. 6 Identification of the physiological races of *Phytophthora capsici* isolates from Guangdong

菌株 isolate	与鉴别寄主的反应 reactions with hosts				结果 result
	Early calwonder(0)	CNPH703 (Race 1)	PBC602 (Race 1,2)	PI201234 (Race 1,2,3)	
Pc. 1	S(100.0)	S(100.0)	S(90.9)	R(6.1)	Race 3
Pc. 2	S(100.0)	S(100.0)	S(93.9)	R(3.0)	Race 3
Pc. 3	S(100.0)	R(12.3)	R(6.1)	R(0.0)	Race 1
Pc. 4	S(100.0)	S(100.0)	S(87.6)	R(3.3)	Race 3
Pc. 5	S(100.0)	S(100.0)	S(93.9)	R(6.7)	Race 3

1) 括弧内数据为接种后第 21 d 的发病率; S: 感病; R: 抗病

3 讨论

本研究对来源于广东不同地区的5个病原菌进行了分离鉴定,经研究表明这5个菌株在CA上诱导产生的孢子囊形态特征和平均大小无明显差异,对照郑小波等^[5]和陆家云等^[7]对辣椒疫霉菌的分类描述,可将它们确定为辣椒疫霉菌 *Phytophthora capsici* Leonian.

近年研究表明,辣椒疫霉菌不同菌株不仅有明显的致病性差异,而且存在生理小种分化^[8-10]. Oelke等^[10]测定了疫病抗性明显不同的18个辣椒材料与来源于墨西哥、美国、意大利、土耳其及韩国的10个菌株的相互反应,鉴别出了引起辣椒根疫病的9个生理小种,同时还确定了引起辣椒叶疫病的4个生理小种.

本研究分离纯化的5个辣椒疫霉菌菌株在菌落形态、菌丝生长速率、致病性等方面同样存在着差异,其中分离自珠海的Pc.3菌株其菌落呈浓密绒毛状,明显有别于其他4个菌株.Pc.3菌株的菌丝不仅在OMA、TA、PSA和CA4个培养基上生长缓慢,而且其产孢能力和致病性也最差.用亚洲蔬菜研究与发展中心提供的鉴别寄主进行鉴定,表明这一菌株为Race 1,其他4个菌株属Race 3,Race 3占绝大多数,由此初步推断广东辣椒疫霉菌以Race 3为优势小种,其原因可能与Race 3的强致病性及产孢能力有关.

根据亚洲蔬菜研究与发展中心对台湾辣椒疫霉菌生理小种的研究结果,近年危害我国台湾辣椒的疫霉病原菌生理小种也以Race 3占优势,同时他们在所研究的辣椒疫病抗源中发现辣椒对生理小种Race 1、2和3的抗性表现出叠加效应,即抗Race 1的辣椒抗源可能只对Race 1表现抗性,而抗Race 2的抗源同时具有对Race 1的抗性或更强的抗性,抗Race 3的抗源则具有对Race 1、2的抗性或更强的抗性^[8].本研究中虽然未检测到Race 2,但从致病力测定中各品种对Race 3和1的抗性表现看,存在同样

的倾向.因此,在选育适合广东地区的辣椒疫病抗性品种过程中,应采用Race 3进行抗性鉴定和抗源筛选,才有可能获得抗性强且具有抗3种生理小种的抗病性材料或品种.

致谢:本研究得到亚洲蔬菜研究与发展中心王添成博士的支持和精心指导,谨此致谢!

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 彭化贤,刘波微,李薇.四川辣椒疫霉菌生物学特性和辣椒抗疫病菌性鉴定方法初探[J].云南农业大学学报,2005,20(1):140-144.
- [3] 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,2004,26(4):413-416.
- [4] 王得元,安康,王汝贤.广州市辣椒疫病病原鉴定[J].广东农业科学,2001(2):37-39.
- [5] 郑小波.疫霉菌及其研究技术[M].北京:中国农业出版社,1997:10-132.
- [6] 易图永,张宝玺,谢丙炎,等.辣椒疫病三种接种方法的比较[J].中国蔬菜,2003(2):16-18.
- [7] 陆家云,龚龙英,何汉兴.疫霉属(*Phytophthora*)真菌生物学及分类研究[J].南京农学院学报,1984,5(1):20-31.
- [8] BLACK L L. Studies on phytophthora blight in pepper[G]//TALEKAR N S. AVRDC Report 1998. Shanhua:Asian Vegetable Research and Development Center, 1999:25-27.
- [9] POLACH F J, WEBSTER R K. Identification of strains and inheritance of pathogenicity in *Phytophthora capsici* [J]. Phytopathology, 1972,62(1):20-26.
- [10] OELKE L M, BOSLAND P W. Differentiation of race specific resistance to phytophthora root rot and foliar blight in *Capsicum annuum* [J]. Journal of American Society for Horticultural Science, 2003,128(2):213-218.

【责任编辑 柴 焰】